



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약 학 박 사 학 위 논 문

화학물질 유도 적혈구의 혈액응고 활성화 및  
용혈에 의한 혈전생성촉진

Thrombotic Effects of Xenobiotics Mediated by Procoagulant  
Activation and Hemolysis in Red Blood Cells

서울대학교 대학원

약학과 예방약학전공

BIAN YIYING

## 국 문 초 록

본 연구는 화학물질에 의한 적혈구 형태변화와 세포독성은 혈전을 일으킨다는 문헌보고를 참고하여 두가지 연구목적으로 수행되었다. 첫 번째 연구주제는 최근 사용이 증가되고 있는 은 나노 (Silver nanoparticle; AgNP)의 잠재적 혈액독성을 검토하기 위하여 적혈구 (RBCs)의 응고 촉진 활성에 의해 매개 된 AgNP에 의한 혈전 유발 가능성을 연구하였다. AgNP 는 적혈구의 혈액응고 촉진의 주요 지표인 PS 노출, MV 생성, 형태 변화를 유도했다. 그 결과 AgNP는 thrombin 생성 및 적혈구의 내피세포 부착을 증가시켰으며 이러한 변화는 ROS 생성 및 세포내 칼슘증가등 기전을 매개한다. 또한, 이러한 in vitro 결과는 정맥혈전 동물모델에서 혈전을 유발됨이 확인됐다. 또한, AgNP는 항암제 paclitaxel의 응고 촉진 효과를 크게 강화시켰으며 혈전증의 위험이 큰 암 환자로부터 분리 된 적혈구에서도 관찰되었다. 종합적으로, AgNP는 적혈구의 응고 촉진 작용을 촉진하여 혈전 형성 위험을 갖고 있으며, 암 환자와 같은 혈전증에 민감한 인구 집단에서는 더욱 위험할 수 있음을 제시하는 결과이다.

두 번째 연구주제는 용혈을 유발하는 여러 화학물질은 혈전위험이 증가됨이 알려져 있지만 그 원인에 관하여는 연구된 바 없다. 따라서 용혈성 활성이 있는 ginsenoside Rg3를 사용하여 용혈이 어떤 과정을 거쳐 혈전생성이 증가하는지를 규명하였다.

Rg3는 인간 적혈구의 용혈을 유도하며 세포막에 pore가 생겨 불규칙적인 debris가 생성되었다. 생성된 debris는 표면에 PS를 노출하고 있으며, 그 결과 thrombin 생성을 증가시켰다. In vivo 실험에서도 Rg3에 의한 PS-bearing debris는 혈전생성을 촉진시키며, 이는  $Pb^{2+}$ 에 의해 유도된 적혈구 형태변화, PS 노출에 의한 혈전생성과는 차이가 있음을 밝혔다.

결론적으로 AgNP,  $Pb^{2+}$ , Rg3와 같은 화학물질이 적혈구에 노출되면 서로 다른 경로의 형태변화, 용혈, PS 노출을 매개하여 procoagulant 활성화와 혈관내피세포에 부착능의 증가를 통하여 in vivo에서 혈전생성이 증가됨을 밝힘으로써 화학물질에 의한 적혈구를 매개한 심혈관계 질환 위험성의 새로운 지견을 제시한다.

**Keywords:** red blood cells (RBCs), thrombosis, PS exposure, silver nanoparticles (AgNP), ROS generation, cancer therapy, hemolysis, ginsenoside Rg3, debris

# 목 차

국문 초록 .....	i
목 차 .....	iii
List of Figure and Scheme .....	vii
List of Abbreviations .....	x
 서 론 .....	 1
I. 혈전 생성에서 적혈구의 역할 .....	1
I-1. 적혈구의 PS 노출에 의한 혈전증 및 이에 관한 기전 ..	1
I-2. 적혈구의 모양 변화 및 MV 생성 .....	4
 II. 은 나노 (silver nanoparticles, AgNP)의 혈전 생성 촉진 .....	7
II-1. 암진단, 치료 및 화학요법에서 AgNP의 임상적 응용.....	7
II-2. AgNP의 독성 우려 및 독성 기전 연구 .....	8
II-3. AgNP의 심혈관계 영향 및 적혈구에 대한 독성연구.....	10
II-4. 암 환자 및 화학 요법 제제의 임상 혈전 보고 .....	11
 III. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진 .....	14
III-1. 용혈과 용혈성 빈혈 .....	14
III-2. 화학물질 유도 용혈 및 임상 보고 .....	15

III-3. 용혈의 혈전 위험성 .....	16
III-4. 인삼주성분인 Ginsenoside Rg3의 적혈구 독성 및 용혈현상 .....	17
연구목적 .....	19
실험방법 .....	22
I. 시약 .....	22
II. 적혈구의 생화학적 변화 및 기전 연구에 관한 측정 .....	23
III. 적혈구의 혈액응고촉진활성 및 내피세포와의 부착 측정	30
IV. 혈소판 실험 .....	32
V. 동물 실험 .....	33
VI. 통계처리 .....	35
실험결과 .....	36
I. AgNP의 혈전 생성 촉진 .....	36
I-1. AgNP의 characterization 및 적혈구에 의한 AgNP세포흡수	36
I-2. AgNP에 의한 적혈구 변화 및 세포 내 기전 연구 .....	37
I-3. AgNP의 PS 노출에 의한 생리학적 의미.....	40
I-4. AgNP의 in vivo 혈전 평가 .....	41
I-5. AgNP 와 chemotherapy agents의 시너지 효과 평가 및 암환자 적혈구에서의 AgNP 혈전 위험성 평가 .....	41

II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진 .....	43
II-1. Rg3에 의한 적혈구 용혈 활성 및 형태학적 변화 .....	43
II-2. Rg3에 의한 intact 와 debris 적혈구의 PS 노출 .....	44
II-3. Rg3에 의한 적혈구의 thrombin 생성 및 혈관 부착 작용 .....	46
II-4. 용혈성 활성이 있는 quinine으로 hemolysis-associated procoagulant activity 평가 .....	46
II-5. Rg3 의 용혈로 인한 혈전독성의 in vivo 평가 .....	48
Figures .....	49
I. AgNP의 혈전 생성 촉진 .....	49
II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진 .....	65
Schemes .....	79
고    찰 .....	81
I. AgNP의 혈전 생성 촉진 .....	81
II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진 .....	85
결    론 .....	87
참고문헌 .....	88

Abstract .....	100
Supplemental .....	102



# List of Figure and Scheme

## I. AgNP의 혈전 생성 촉진

Figure 1   Characterization of AgNP and its cellular uptake by human RBCs. ....	49
Figure 2   Hemolytic responses of human RBCs by AgNP and AgMP. ....	51
Figure 3   Effects of AgNP and AgMP on PS exposure and MV generation ....	52
Figure 4   Effects of AgNP and AgMP on morphological changes of human RBCs. ....	53
Figure 5   Effects of AgNP and AgMP on intracellular mechanism of human RBCs. ....	54
Figure 6   Role of ROS and $[Ca^{2+}]_i$ on PS exposure and morphological change induced by AgNP. ....	56
Figure 7   Procoagulant activity of PS exposure induced by AgNP. ....	58
Figure 8   Increased adherence of AgNP-treated RBCs to human umbilical vein endothelial cells. ....	59
Figure 9   PS exposure and thrombin generation by AgNP in isolated RBCs from rats.	60
Figure 10   <i>In vivo</i> relevance of AgNP-induced thrombosis. ....	61
Figure 11   Synergy effects of AgNP with chemotherapy agent. ....	62
Table 1   Information of cancer patients in this study ....	63
Figure 12   AgNP-induced PS exposure and ROS generation in isolated RBCs from cancer patients. ....	64
Scheme 1   Suggested mechanism for the procoagulant activity of red blood cells (RBC) by silver nanoparticles (AgNP). ....	79

Supplemental Figure 1   PS exposure of RBCs induced by ionic silver (0.1 $\mu$ M) .....	102
Supplemental Figure 2   PS exposure of RBCs induced by low concentrations of AgNP after a prolonged exposure .....	102
Supplemental Table 1   Summary of physiochemical properties of AgNP and AgMP .....	103

## II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진

Figure 13   Effects of $Pb^{2+}$ and Rg3 on hemolytic activity in human RBCs. ....	65
Figure 14   Confocal observation of morphological changes induced by $Pb^{2+}$ and Rg3 in human RBCs. ....	66
Figure 15   Scanning electron microscopioic observation of morphological changes induced by $Pb^{2+}$ and Rg3 in human RBCs. ....	67
Figure 16   PS exposure of human residual RBCs by $Pb^{2+}$ and Rg3. ....	68
Figure 17   Intracellular molecular events underlying PS exposure of human residual RBCs by $Pb^{2+}$ and Rg3. ....	69
Figure 18   Identification of PS exposure on RBC debris by Rg3. ....	71
Figure 19   Biological effects of PS exposure by Rg3 treatment. ....	73
Figure 20   <i>In vivo</i> hemolysis and RBC fragility induced by Rg3. ....	75
Figure 21   <i>In vivo</i> PS exposure in residual and debris RBCs induced by Rg3. ....	76
Figure 22   <i>In vivo</i> procoagulant activity of RBCs increased by Rg3. ....	77
Figure 23   <i>In vivo</i> relevance of hemolysis-associated thrombus formation induced by Rg3. ....	78

Scheme 2   Suggested mechanism of hemolysis-associated thrombosis. ....	80
Supplement.Figure 3   Effect of $Pb^{2+}$ and Rg3 on platelets activation. ....	104
Supplement.Figure 4   Effect of quinine on hemolysis and morphological changes in RBCs. ....	105
Supplement.Figure 5   Identification of PS exposure of RBC debris and biological effects induced by quinine ....	106

# List of Abbreviations

ACD: acid citrate dextrose

AgNP: silver nanoparticles

AgMP: silver microparticles

aPTT: activated partial thromboplastin time

ATP: adenosine triphosphate

BSA: bovine serum albumin

CMFVP: cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, vincristine and prednisone

DIHA: drug-induced hemolytic anemia

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

FTTC: fluorescein isothiocyanate

G6PD: glucose-6-phosphatase dehydrogenase

GSH: glutathione

HA: hemolytic anemia

HEPES: N-2-hydroxyethylpiperzine-N'-2-ethanesulfonic acid

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

MV: microvesicles

NAC: N-acetylcystein

PBS: phosphate buffered saline

PC: phosphatidylcholine

PE: phycoerythrin

PI: phosphatidylinositol

PLT: platelets

PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

PS: phosphatidylserine

PT: prothrombin time

PTX: paclitaxel

RBC: red blood cells

Rg3: ginsenoside Rg3

ROS: reactive oxygen species

SCD: sickle cell disease

SD rat: spargue dawley rat

SEM: scanning electron microscope

SM: sphingomyelin

TEM: transmission electron microscope

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

Tro. : trolox

Vit.C: vitamin C or ascorbic acid

U: unit



# 서론

## I. 혈전 생성에서 적혈구의 역할

적혈구는 혈액 세포중 가장 많은 세포로서 산소 전달이 그의 주된 기능으로 잘 알려져 있다. 정상적인 적혈구는 핵이 없고 특유의 모양으로 discocyte라고도 한다. 적혈구에 의한 질환은 세포의 용혈이나 제거에 의한 빈혈 및 수반된 증상들이 많이 보고되어 왔고 최근 여러 연구들에서는 적혈구가 심혈관계 질환 특히 혈전증 생성 및 심화에 중요한 역할을 할수 있다고 보고 되어 왔다 (Andrews and Low 1999).

### I-1. 적혈구의 PS 노출에 의한 혈전증 및 이에 관한 기전

#### *I-1-1). 적혈구의 PS 노출을 매개로 혈액 응고 촉진 활성 증가*

적혈구의 세포막은 인지질의 구성에 있어 비대칭성으로 유지하고 있다. Sphingomyelin (SM) 과 phosphatidylcholine (PC)는 주로 세포막 바깥쪽에 존재하고, PS 과 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI)는 세포막 안쪽에 존재한다. 세포막의 비대칭성이 붕괴되어 PS 가 세포 안쪽으로부터 세포 외막으로 전이 되는 현상을 PS 노출이라고 한다. PS 노출은 많은 세포에서 세포 사멸 과정의 생체 지표로 잘 알려져 있고, 혈소판, 적혈구, 백혈구, 혈관 내피 세포와 같이 혈전 생성에 기여하는 세포들에서는 혈액 응고를 일으키는

주요 기전으로 알려져 있다. PS는 혈액 응고 과정시 tenase 및 prothrominase 복합체에 결합부위를 제공함으로써 factor X과 prothrombin 을 각각 factor Xa와 thrombin 으로 전환 시키는것을 촉진하고 (Zwaal, Comfurius et al. 1977, Zwaal and Schroit 1997), 이러한 활성을 혈액 응고 촉진 활성 (procoagulant activity)라고 한다. 또한 활성화된 혈액 세포를 토대로 thrombin 의 생성이 증가한 것을 실험적으로 측정하여 그 생물학적 역할을 평가할수 있다. 또한 적혈구 세포막으로부터 유래된 microveisicle (MV) 도 PS를 노출하고 있어 혈액 응고 촉진 활성을 가진다 (Franck, Bevers et al. 1985).

#### *I-1-2). 적혈구 PS 노출의 주요 기전*

PS 노출은 생체내에서 적혈구의 기능 변화에 중요한 부분을 차지하고 있기 때문에 세포막에서 다양한 기전에 의해 조절된다. 적혈구의 지질 이중막의 비대칭적인 구성은 Sphingomyelin (SM) 과 phosphatdylcholine (PC)는 주로 세포막 바깥쪽에 존재하고, PS 과 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI)는 세포막 안쪽에 존재한다. 이러한 세포막의 비대칭성 유지 및 붕괴에 관여하는 효소로는 aminophospholipid translocase (flippase), floppase, scramblase가 있다. Flippase는  $Mg^{2+}$ -ATP를 매개로 PS와 PE를 외막으로 운반한다. 반면 scramblase는 적혈구 셀내의 칼슘 증가를 매게하여 세포막 지질들을 비특이적으로 교란시키고 결과적으로 PS노출을 유발하는 역할은 한다 (Seigneuret and Devaux 1984). 세포막 지질 이동에 관여하는 세 가지 효소들 중 floppase의 작용은 다소



비특이적이기 때문에 PS 노출의 병리적인 현상을 언급시 주로 flippase와 scramblase 활성화로 설명한다.

세포막 비대칭 붕괴 및 지질 전이를 조절 하는 효소들의 활성화는 reactive oxygen species (ROS)생성이 핵심적인 역할을 하고 있다고 많이 알려져 있다 (Banerjee and Kuypers 2004). 이는 주로 산화적 스트레스 등 자극에 의해 ROS 생성, glutathion 고갈 및 ATP의 고갈이 동반된다 (Brookes, Yoon et al. 2004, Circu and Aw 2010). 또한, 세포막 비대칭 붕괴 및 지질 전이를 조절 하는 효소들의 활성화는 세포 내 칼슘에 의해 조절한다고 보고 되어 있다 (Comfurius, Senden et al. 1990). Scramblase는 calcium-binding site를 가지고 있으며 칼슘에 의해 활성화하는 반면 flippase는 0.2  $\mu\text{m}$  이상의 세포 내 칼슘 증가에 의해서도 그 활성이 억제된다 (Daleke 2003).

최근에는 apoptosis에서 caspase-3 가 적혈구의 PS 노출에도 관여한다는 것이 보고 되기도 하였다 (Mandal, Mazumder et al. 2005). 또한 이러한 caspase-3 활성화는 셀 내 칼슘 증가와도 관여한다고 보고 한다 (Sharma and Rohrer 2004). 이와 같은 현상은 산화적 스트레스에 의해 유발되었으며 caspase-3는 flippase등의 활성을 유지하는 데에 영향을 미친것으로 생각하였다 (Matarrese, Straface et al. 2005).

이상의 연구들에서 보고한 바와 같이 적혈구 PS 노출은 ROS 생성, GSH 및 ATP 고갈, 셀 내 칼슘 증가, 그리고 caspase-3 활성화등의 변화가 중요한 기전으로 작용한다. 따라서 적혈구는 외부의 다양한

stimuli들에 의해 이러한 intracellular events를 거쳐 결과적으로 scramblase 및 flippase활성의 변화를 초래해 PS 노출을 유발한다.

## I-2. 적혈구의 모양 변화 및 MV 생성

### *I-2-1) 적혈구의 모양 변화 및 MV 생성*

Human 적혈구는 사이즈가 6-8  $\mu\text{m}$ 이며 모양은 discoid 처럼 보여 normal RBC를 discocytes라고도 한다. 여러 가지 요인들에 의해서 적혈구의 모양 변화를 유발 할수 있다. 다양한 amphiphatic agents (Deuticke 1968, Tatsuzo, Takashi et al. 1979), pH 변화 (Deuticke 1968), 세포내 칼슘 증가 (Deuticke 1968), 그리고 ATP양의 감소 (Birchmeier and Singer 1977)들에 의해서 정상적인 적혈구는 discocytes에서 echinocytic form (echinocytes)로 변화되면서 점차 spherocytic form (spherocytes)로 발전된다. 또한 유전성 질환인 hereditary spherocytosis 과 같은 질병 상태에서도 적혈구의 비정상적인 모양이 관찰된다 (Mohandas and Chasis 1993).

Sheetz (1983)에 의해 제안된 bilayer coupled hypothesis는 이러한 여러 가지 원인들로 인한 적혈구의 모양 변화를 잘 설명하였다. 이 가설에 의하면 음전하를 띤 물질은 중성 또는 양전하를 띤 인지질들이 풍부한 세포막의 외부에 분포하게 되며 이로 인해 세포막 외부층이 팽창하게 되고 결과적으로 세포막 내부층의 표면적이 외부층에 비해 상대적으로 작아지게 되어 echinocytic form (echinocytes)로 변하게 된다. 또한 이러한 모양 변화 과정에서 적혈구의 세포 외막으로 부터

작은 돌기가 형성하는 것과 동반되게 사이즈가 작은 구형 vesicle (microvesicles,  $MV \leq 1\mu m$ )의 형태로 세포막의 일부가 떨어져 나오는데 이러한 과정을 vesiculation이라 하며 떨어져 나온 부분을 MV이라고 한다. Vesiculation 과정은 적혈구의 모양 변화와 수반되어서 관찰된다. Normal discocytes가 echinocytes로 변화되고, 세포막에서부터 MV가 떨어져 나가면서 적혈구 세포막 표면적이 작아짐에 따라 점차 spherocytes로 변화된다 (Iglič, Kralj-Iglič et al. 1998).

### *I-2-1) MV 생성 및 혈전증*

MV는 내피 세포, 혈소판, 백혈구 및 적혈구의 원 세포막에서 유래한  $0.1 \mu m$ 에서  $1 \mu m$  크기의 작은 소포이다. MV는 항원과 수용체를 다른 타입의 세포로 옮길 수 있다. Circulating MV는 응고의 특정 효소의 집합을 위한 procoagulant aminophospholipid 표면을 제공한다. Tissue factor와 PS 는 모두 이러한 MV 외막에 노출 되어 있다. 이로써 간접적으로 응고 활성을 증진 시킨다.

많은 연구에서 보고 된 바 MV는 생리학적 및 병리학적으로도 중요한 현상이다. 또한, 오래 기간 동안의 연구에서는 MV는 혈액 응고 및 지혈과 관련이 있다고 알려져 있다. MV 이 in vivo 내에서 응고 응집제인지는 완전히 잘 알려진 문제는 아니지만, MV 매개 응고가 임상적으로 중요하다는 것을 입증하는 보고가 많다. 심혈관계의 질환 (Shantsila, Kamphuisen et al. 2010), 용혈성 빈혈 (e.g. sickle cell disease) (van Beers, Schaap et al. 2009) 또는 신장 질환 (Gao, Xie et

al. 2012), 당뇨병 (Rodrigues, Pietrani et al. 2018), 다양한 암질환 (Aharon and Brenner 2009)등과 같은 여러한 질병 상태에서는 MV생성이 많이 관찰되어왔다. 또한 이러한 MV는 PS 노출을 수반하여 hypercoagulable state로 유지되어 점차 혈전증에 기여하는것으로 보고 되었다.

## II. 은 나노 (silver nanoparticles, AgNP)의 혈전 생성 촉진

나노 물질은 사이즈가 100 nm 이하로 흔히 반도체, 센서, 전기 화학, 광학 및 의학적으로 응용이 많아지고 있다. 카본 제제, 리포솜, 폴리머 등으로하는 비 금속 적인 나노 물질의 응용도 많지만 골드 나노 및 은 나노 와 같은 금속 재질로 만든 나노 물질의 각 분야에서의 응용이 점차 많아 지면서 나노 물질의 응용에서 금속 나노 물질의 응용이 가장 주류적으로 발전하고 있다. 그중 은 나노의 항 박테리아, 항 바이러스 등 특성으로 각 분야에서 25 %의 큰 비중의 응용으로 돋보이고 있다 (Vance, Kuiken et al. 2015).

### II-1. 암 진단, 치료 및 화학 요법 에서 AgNP의 임상적인 응용

AgNP는 흔히 anti-bacterial, anti-tumor, anti-angiogenic 및 anti-infective한 특성으로 특히 의학적으로 많이 사용하고 있다. Robert Burrell은 세계 최초로 만성 궤양, 독성 표피 괴사 및 천포창 등 다양한 상처를 치료 가능한 AgNP제품 (Acticoat<sup>™</sup>; Smith and Nephew, London, UK)을 제조하여 (Chaloupka, Malam et al. 2010) 다양한 상처 치료에 많이 사용하고 있다.

AgNP 는 특히 cancer research 에서 응용이 점차 커지고 있다. 의학적으로 질병 치료 및 진단에 광범위하게 사용되며 약물 운반체, 나노 탐침, 바이오 이미징 및 라벨링 제제로서 인기가 높아지고 있다 (Homan, Shah et al. 2010, Larginho and Baptista 2012, Ong, Lim et al.

2013). 약물 전달 비히클을 바탕으로 효과적인 암 치료를 위한 표적 약물 전달에 기반한 나노 제제화 약물이 개발되었다. 이 약물은 나노 캐리어, 암 특정 수용체 또는 일반 수용체로 구성되는 나노 제제로서, 세포가 정상인지, 악성인지 또는 양성인지를 확인하는 물질 감지 (as sensor), 암의 병기 결정을 위해 세포에 의한 나노 물질의 섭취량을 나타내는 물질 (for detection) , 대 전 분자에 싸인 약물, 안정화 및 결합제. 안정화 제제 또는 결합제등으로 구성 되어 있다. 이러한 나노 제제는 외부의 전위에 의해 나노 약제가 붕괴시키고 약물을 방출하며 치료를 진행할 수 있다. 약물의 방출 양 및 시간은 또한 볼티지 온 앤 오프를 통해 정확하게 제어 가능하다. 따라서 나노 제제는 화학 요법에 특히 유리할 수 있어서 암환자의 진단 및 치료에서 많이 응용하고 있다 (Soumya and Hela 2013).

## II-2. AgNP의 독성 우려 및 독성 기전 연구

그러나 나노제제에서 AgNP의 응용과 함께 인체 건강에 대한 잠재적 인 독성에 대한 우려도 커지고 있다. 지난 5 년 동안 AgNP 독성에 대한 연구가 엄청나게 증가했으며, 흔히 생물 의학 응용에 사용되는 AgNP은 잠재적으로 독성이 있는 것으로 밝혀졌다. 더욱이, AgNP 독성의 기전은 아직 명확하게 연구되어 있지않으며, 현재 알려진 바와 같으면 AgNP 자체의 물리적 특성, 즉 AgNP의 크기(Park, Neigh et al. 2011), 형태 (Mock, Barbic et al. 2002) 및 표면 전하 (El Badawy, Silva et al. 2010) 및 기능화 (Sharma, Siskova et al. 2014)에

의존한다고 보고 되어 있다.

인체 건강에 대한 AgNP의 잠재적 부작용은 산화 스트레스 (oxidative stress) 및 ROS 생성과 밀접한 관계가 있다 (Foldbjerg, Olesen et al. 2009, Guo, Zhang et al. 2015). 산화 스트레스 및 ROS의 과도한 생성은 AgNP에 의한 독성에서만 나타날 뿐만 아니라 인체 건강에서의 유지 및 유전 독성, 염증, 섬유증 등 다양한 병리학적 질환에서도 관여한다 (Scherz-Shouval and Elazar 2011). 또한 AgNP은 인체 세포주에서 세포 독성 및 유전적인 독성을 일으켜 DNA damage, cell cycle arrest, chromosomal, ATP 고갈 등 일련의 셀 기전을 일으킬수 있다고 보고 되어 왔다 (AshaRani, Low Kah Mun et al. 2008).

AgNP의 독성 연구는 in vitro 다양한 세포주에서 및 in vivo에서도 많이 연구 되어 왔다. AgNP의 in vitro 독성은 쥐의 간 유래 세포 (BRL3A), 포유류 배아 줄기 세포 (Hussain, Hess et al. 2005), A431 인간 피부 암종 및 HT-1080 인간 섬유 육종 세포주 (Arora, Jain et al. 2008),뿐만 아니라 세포 독성 인간 폐 섬유 아세포 (IMR-90) 및 인간 아교 모세포종 세포 (U251)에서의 AgNP의 세포 독성 및 유전 독성을 밝혔다(AshaRani, Low Kah Mun et al. 2008). 그중 쥐의 간 유래 세포 (BRL3A)를 AgNP에 노출 시켰을 때, 젖산 탈수소 효소 (lactate dehydrogenase)의 leakage가 증가하고 24 시간 노출 후 미토콘드리아 기능이 저하됨으로 (각각  $\geq 5 \mu\text{g/mL}$  와  $\leq 10 \mu\text{g/mL}$  에서) (Hussain, Hess et al. 2005) AgNP의 잠재적인 독성 영향을 뒷받침 하였다. 또한, in vivo 시스템에서도 AgNP의 세포 독성, 유전독성, 면역 독성 등

다양한 AgNP exposure 루트에 따라 평가를 진행해왔다 (Kim, Kim et al. 2008, Ordzhonikidze, Ramaiyya et al. 2009, Kim, Sung et al. 2011, van der Zande, Vandebriel et al. 2012). 28 일 동안 쥐에게 AgNP를 정맥 투여하고 면역 독성을 밝혔고(Vandebriel, Tonk et al. 2014), 또 다른 연구에서는 쥐에게 28 일간 구강 투여시 각 기관의 AgNP 축적을 관찰하여 독성을 평가하였다.

### II-3. AgNP의 심혈관계 영향 및 적혈구에 대한 독성연구

AgNP는 혈액을 통해 전신 순환계로 간, 비장, 폐, 신장, 심장, 뇌 등 인체 각 기관으로 쉽게 전이한다. 따라서 혈액 세포, 심장 및 혈관과 같은 심혈 관계 조직에 AgNP가 쉽게 접근 할 수 있어 AgNP의 잠재적인 심혈 관계 독성에 많은 관심이 모인다. 전에 보고된 바와 같이 AgNP는 혈소판을 활성화시켜 궁극적으로 동맥 혈전증을 증가시키는 데 기여한다는 사실을 입증했다 (Jun, Lim et al. 2011). 또한, 암 (Lee and Levine 2003), 외과수술, 외상 (Heit, Silverstein et al. 2000) 및 중금속 중독 (Lim, Kim et al. 2010), 말라리아 (Francischetti, Seydel et al. 2008) 등 다양한 질환 환자들은 흔히 과응집상태 (hypercoagulable state)로 혈전이 흔히 보이는 합병증 중 하나이며 이러한 심각한 혈전으로 생명을 위협하고 있다. 혈소판 외에도 혈액의 주요 세포 성분인 적혈구는 프로트롬빈나제 (prothrombinase) 및 테나 제 (tenase) 복합체의 집합 부위를 제공하여 혈액 응고 형성을 촉진하여 정맥 혈전증에 참여할 수 있다 (Zwaal and Schroit 1997).



AgNP에 관한 적혈구의 손상에 관한 연구는 용혈(hemolysis) 및 구조적 변화등으로 보고 되었다. AgNP는 사이즈 및 모양에 따라 용혈이 나타나지만 이러한 용혈 현상은 높은 농도 (up to 500  $\mu\text{g/mL}$ ) 의 AgNP를 처리시 관찰되었다 (Kim and Shin 2014). 따라서 생리학적으로 의미가 있는 낮은 농도의 AgNP에 의한 적혈구의 손상 및 독성 기전을 밝히는 것이 중요하다. 흔히 잘 알려진 AgNP의 anti-bacterial 작용은 50 ~100  $\mu\text{g/mL}$ 내외에서부터 효과가 보여 (Shrivastava, Bera et al. 2007), 우리는 이런 농도 범위를 생리학적으로 의미가 있는 농도범위라고 생각한다. 또한, 적혈구의 손상에 관한 연구에서 100  $\mu\text{g/mL}$  의 AgNP는 haemagglutination, 적혈구 sedimentation rate, membrane topography 및 lipid peroxidation등이 관찰되었다 (Asharani, Sethu et al. 2010). 하지만 AgNP에 의한 적혈구의 독성은 적혈구의 초기 손상등에 국한되어 더 나아가서 어떠한 질병과 어떠한 기전으로 되어있는지에 관한 연구는 잘 알려져 있지 않았다.

#### II-4. 암 환자 및 화학 요법 제제의 임상 혈전 보고

암 환자는 종양 유형, 병기, 치료 요법 및 기타 요인에 따라 다르지만 혈전증 발생은 모든 암 유형과 병기간에 공통적인 특징을 나타낸다. 임상 연구에 따르면 모든 암 환자중 약 18 %가 혈전증 발생을 보였다 (Heit, Silverstein et al. 2000). 국제 전향 적 연구에 따르면 증상이있는 급성 정맥 혈전 색전증을 나타낸 참가자의 20 %가 활동성 암을 앓고 있음이 발견되었다 (Prandoni and Monreal 2008).

Trousseau 증후군을 앓고있는 환자, 진단되지 않은 종양 보유자에서 발생하는 악성 종양과 관련된 혈전 색전증 경향은 암 환자의 약 15 %에서 뇌졸중이 으페 암의 초기 징후였다 (Rak, Joanne et al. 2006, Kwon, Kang et al. 2007). 또한, 암 질환의 종류와 단계에 따라 혈전증의 위험성도 다르지만, 최소는 localized 종양이 있는 환자에서 나타나는 2-3배 이상의 혈전 위험, 많아서 metastasis 암환자에게서 나타나는 무려 58배의 혈전증 위험이 보고 되어 있다 (Lee and Levine 2003). 1977-1992 년 덴마크 국립 국가 레지스트리 (Danish National Registry of Patients)의 연구에 따르면 1 차 심 부정맥 혈전증 후 암 진단의 위험성을 평가 한 결과, 15,348 명의 심한 정맥 혈전증 환자 (11.3 %)의 코호트에서 1737 명의 암이 발견되었다 (Sørensen, Mellekjaer et al. 1998). 따라서 정맥 및 동맥 혈전 모두 암 환자에서 나타날 수 있다.

또한, 화학 요법은 혈전증의 발병에서 중요한 위험 인자로 잘 알려져 있다. 화학 요법을 받는 악성 질환 환자에서 혈전의 연간 발병률은 10.9 %로 추산되고 있다 (Heit, Silverstein et al. 2000). 일반 인과 비교했을 때, 혈전의 위험은 암 환자에서 4.1 배 증가하고, 이 환자가 화학 요법을 받는 동안 6.5 배 이상으로 증가한다고 보고 되어 있다 (Lee and Levine 2003). 화학 요법 제제로써 항암제와 혈전증의 인과 관계를 뒷받침하는 대부분의 임상 증거는 유방암에 대한 임상 시험에서 가장 잘 알려져 있다 (Lee and Levine 1999). 초기 유방암 환자의 혈전증 위험은 1% 미만이지만 화학 요법으로 치료할 경우

환자의 혈전증 위험은 무려 2~10%로 증가할 수 있다 (Levine 1997). cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, vincristine and prednisone (CMFVP)로 치료 한 4 기 metasis 질환 환자에서 혈전증 발생률은 18 %로 보고 되었다 (Goudnough, Saito et al. 1984).

또한 이러한 암 치료 약물은 적혈구에 의해 혈전증의 마커로 생각하는 PS 노출을 심화시키는 연구가 많이 알려져 있다. Perifosine, temisirolimus, treosulfan (Peter, Bissinger et al. 2015, Bhuyan, Cao et al. 2017, Egler and Lang 2017) 등과 같은 20여가지의 약물에 의한 적혈구의 PS 노출 및 혈전증에서 중요한 역할을 하는 ROS의 생성과 셀 내 칼슘 증가 등의 지표등을 in vitro 실험계에서 관찰되어 왔다. 이러한 결과는 아직 잘 알려지지 않은 많은 약물에서도 혈전 독성이 나타날것으로 추산된다.

따라서 AgNP가 암 진단, 치료 및 화학 요법에서의 응용은 임상에서 암환자 자체의 혈전 위험성 및 화학 요법으로 인한 혈전증 위험 증가, 더불어 AgNP의 혈전 독성을 함께 고려시 의학적으로 더 큰 우려가 될수 있다고 생각한다.

### III. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진

화학물질에 의한 용혈성 빈혈과 혈전증은 가장 많이 나타나는 부작용으로 알려져 있다. 많은 임상사례증거로써 용혈성 빈혈과 혈전은 연관되는듯 보인다. 하지만 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진에 관한 메커니즘에 대해서는 잘 알려지지 않았다.

일반적으로 혈전증을 촉진시키는데 있어 적혈구의 기여에 대해 제안되는 한가지 메커니즘은 주로 PS 노출을 통해 응고 형성을 촉진한다는 것이다. 적혈구 노화와 같은 특정 병리학적 조건에서 PS exposure와 MV releasing 또한 혈전증에 기여할수 있다. 패혈증 (Nieuwland, Berckmans et al. 2000), 신장 증후군 (Gao, Xie et al. 2012) 및 관상 동맥 증후군 (Mallat, Benamer et al. 2000)과 같은 혈전증을 수반하는 질병에 대해 prothrombotic risk와 PS 노출 및 적혈구 유래 MV 사이의 연관성이 잘 알려져 있다.

#### III-1. 용혈과 용혈성 빈혈

용혈은 적혈구의 조기 파괴이다. 골수 활동이 적혈구 손실을 보상할 수 없으면 용혈성 빈혈이 발생하게 된다. 빈혈의 중증도는 용혈의 시작이 점진적인가 갑작스러운 것인지 그리고 적혈구 파괴 정도에 달려 위험성도 다르다. 심각하지 않는 용혈은 무증상 일 수 있지만 심한 용혈로 인한 빈혈은 생명을 위협 할 수 있으며 협심증과 심폐 기능 부전 및 혈전증을 일으킬 수 있다.

용혈성 빈혈은 외인성 또는 내인성 일수 있다. 내인성 용혈성 빈혈은 신체에서 생성된 적혈구가 제대로 기능을 하지 못했을 경우 발생한다. 이러한 질환은 흔히 유전적이며 구상 세포증 (hereditary spherocytosis), 지중해 빈혈 (thalassemia), 겸상 적혈구 병 (sickle cell disease) 글루코오스 -6- 인산 탈수소 효소 결핍증(G6PD-deficiency) 및 발작성 야간 혈색소뇨증 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 등이 잘 알려져 있다. 외인성 용혈성 빈혈은 비장이 건강한 적혈구를 걸러 내거나자가 면역 반응을 일으키는 경우와 같이 여러 가지 방법으로 발생한다. 또한 외인성 용혈성 빈혈은 적혈구 파괴로 인해 발생한다. 예를 들면 shiga toxin 등에 의한 감염, 다양한 종양, 자가 면역 질환, 백혈병, 림프종 및 화학물질의 부작용에 의해 발생할수 있다.

용혈성 빈혈은 여러 원인을 가지고 있으며 임상 증상은 병인에 따라 다를 수 있다. 임상에서 가장 많이 나타나는 증상으로는 피부가 창백하고, 피로, 열, 혼동, 현기증등이 있다. 임상에서 빈혈을 진단시 다음과 같은 검사를 진행하고 한다. 첫번째로는 complete blood count (CBC)를 검사하여 hemoglobin 와 hematocrit level 를 측정한다. 낮은 hemoglobin 또는 hematocrit level 는 빈혈의 징조이다. 정상적인 범위는 특정 인종 및 민족 집단에 따라 다를 수 있지만 일반적으로 >

### III-2. 화학물질 유도 용혈 및 임상 보고

약물, 백신, 약초, 독신, 중금속 물질 등이 포함한 xenobiotics 로 인한 용혈성 빈혈이 나타날수 있으며 이러한 용혈성 빈혈은 흔히 drug-

induced hemolytic anemia (DIHA)로 불리기도 한다 (Mintzer, Billet et al. 2009, Shander, Javidroozi et al. 2011, Rao 2014 9e). 지금 보고된 바는 최소 125 개의 약물이 DIHA 의 위험성을 보인다. 그들의 작용 기전은 각각 다르지만 크게로 면역적 HA 과 비면적 HA 으로 분류를 할 수 있다. 면역적 HA 를 유도할수 있는 가장 잘 알려진 약물은 페니실린이며 (Petz, Fudenberg et al. 1966), 또한 세 팔로 스포린 (Ehmann 1992)및 퀴니 딘 (Freedman, Barr et al. 1956, Zeigler, Shadduck et al. 1979) 등의 용혈 보고도 잘 알려져 있다. 비면역적 HA 를 유도하는 약물로써 비타민 제제가 많이 알려져 있으며(Ibrahim, Sallam et al. 2006, Livshits and Nelson 2010), 그중 비타민 c (ascorbic acid)는 용혈이 많이 나타나며(Rees, Kelsey et al. 1993), 또한 소량 복용시 혈전을 치료하는 아스피린은 과다 복용시 용혈이 나타난다고 알려져 있다 (Shahidi and Westring 1970, Stockman III, Lubin et al. 1978).

### III-3. 용혈의 혈전 위험성

흥미롭게도 다양한 HA환자에게서 과 응집 상태는 종종 관찰되며, HA 환자에서 혈전은 주요 합병증으로 알려져있다 (Ataga 2009). 총 308명의 다양한 HA 환자에서 무려 38명이 정맥 혈전 색전증, 현장 폐동맥 혈전증 및 뇌졸중을 포함한 다양한 혈전 합병증이 관찰되어왔다 (Barcellini, Fattizzo et al. 2014). 이러한 결과는 적혈구가 역할을 할 수 있는 HA와 혈전증 사이의 가능한 연결을 제안한다. 오래 동안 잘

알려진 바와 같이 SCD 환자는 다양한 혈전 발생이 쉬운 편이다. 이전의 연구에서 보고된 바, 1,523 명의 SCD환자에서 무려 11.3 %의 환자들이 다양한 혈전증이 보여 높은 발생률을 보일 수 있다 (Naik, Streiff et al. 2014). 또한 혈전증과 HA의 동시 발생이 많은 환자에게서 나타나는 보고가 있었다 (Bennett, Weinberg et al. 1998, Wadhwa 2000, Sonikpreet, Oberoi et al. 2014)

약물에 의해 나타나는 혈전 위험이 동반되는 HA도 많이 보고되어 있다. 총 344개의 case report중 78 개의 약물의 HA 및 혈전 보고에 관한 보고서를 총괄한 결과, 그중 22개의 약물은 확실한 HA와 혈전이 동반되어 나타나는 것으로 보고되었다. 104 명의 환자에서 34명은 퀴닌, 15명은 cyclosporine, 12명은 tacrolimus의 약물을 복용한 뒤 HA와 혈전 동반 현상이 보였다 (Al-Nouri, Reese et al. 2015).

#### III-4. 인삼주성분인 Ginsenoside Rg3의 적혈구 독성 및 용혈현상

Panax 인삼 C. A. Meyer 의 뿌리 인삼은 다양한 건강기능으로 아시아 국가에서 한약제로 오랫동안 섭취되어 왔습니다. 아시아 국가의 사람들은 인삼 제품을식이 보충제로 광범위하게 섭취했으며, 비정상적인 건강 상태에 대한 광범위한 만병 통치약으로 간주했습니다. 실제로 인삼은 혈소 저감, 항암, 항 노화, 항염증제 및 항산화 제 활동을 포함하는 많은 약리학 적 효과를 지니고 있으며 (Helmes, 2004; Karmazyn et al., 2011) 주로 ginsenosides (예 : ginsenoside Rg3), 인삼의 주요 사포닌 성분. 그러나 최근 수십 년 동안 인삼과 관련된

건강 위험에 대한 우려는 점차 확대되어 왔는데, 이는 주로 과도한 소비와 오용으로 인한 안전성에 대한 증거가 아닙니다 (Ernst, 2002). 인삼의 정맥 조제조차도 일부 국가에서 약물 치료 전략의 일환으로 개발되었다 (Haijiang et al., 2003).

많은 보고서에 따르면 불면증, 설사, 질 출혈, 메스꺼움, 구토, mastalgia, 고혈압 및 저혈압에서 약물 상호 작용에 이르기까지 인삼의 다양한 부작용이 밝혀졌으며 임상 시험 및 사례 보고서의 증거에 의해 강력하게 뒷받침되었습니다 (Coon and Ernst, 2002; Siegel, 1979, 1980). 이 중 용혈, 고혈압 / 저혈압, 혈관 장애 및 혈액 독성과 관련하여 ginsenoside Rg3의 심혈 관계 독성의 잠재적 인 가능성이있다 (Jung et al., 2018; Lee et al., 2010; Liu et al., 2012; Liu et al., 2003 ; Siegel, 1980)은 ginsenoside Rg3의 심혈 관계 조직 완전성과 기능에 대한 심오하고 광범위한 영향을 언급하고있다. 우리는 ginsenoside Rg3가 강력한 용혈 효과를 가지고 있음을 발견하게되었지만 (Li and Liu, 2008; Liu et al., 2003; Liu et al., 2002), 건강 결과는 비교적 알려지지 않았다.



# 연구 목적

## I. AgNP의 혈전 생성 촉진

은 나노 (AgNP)는 의학적으로 질병 치료 및 진단에 광범위하게 사용되며 약물 운반체, 나노 탐침, 바이오 이미징 및 라벨링 제제로서 많이 사용하고 있다. 그러나 AgNP의 응용과 함께 인체 건강에 대한 잠재적 인 독성에 대한 우려도 커지고 있다. 인체 건강에 대한 AgNP의 잠재적 부작용은 인체 세포주, 활성 산소 종 (ROS) 생성, 산화 스트레스 (oxidative stress), 세포주기 정지 (cell-cycle arrest), pro-apoptotic 효과 및 유전 독성에 대한 세포 독성과 관련하여 밝혀졌다.

AgNP는 전신 순환계로 쉽게 전이한다. 따라서 혈액 세포, 심장 및 혈관과 같은 심혈 관계 조직에 AgNP가 쉽게 접근 할 수 있어 AgNP의 잠재적 인 심혈 관계 독성에 많은 관심이 모인다. 암, 외과수술, 외상 및 중금속 중독 등 다양한 질환 환자들은 흔히 과응집상태 (hypercoagulable state)로 혈전이 흔히 보이는 합병증 중 하나이며 이러한 심각한 혈전으로 생명을 위협하고 있다. 많은 연구보고에서는 암환자의 혈전 위험이 건강인에 비해 4.1배나 많은 리스크 경향이 보이며 암 치료시 화학 요법 제제로 인한 혈전 위험성은 6.5 배나 증가한다고 보고 되어 왔다. 또한 암환자중 18% 의 환자들이 다양한 혈전 리스크가 보고 되어 왔다. 따라서 AgNP의 혈전 독성연구는 아주 중요하고 필요하다.

적혈구는 혈액 세포중 가장 많은 세포로서 PS 노출 및 MV 생성을 매개로 혈전증에서 중요한 역할을 하는것으로 잘 알려져 있다. AgNP에 의한 적혈구의 독성 연구는 많이 진행 되어왔지만 높은 농도 (500  $\mu\text{g/mL}$ )에서 용혈 등 기초적인 적혈구 유변학 현상을 보이며 또한 in vitro에서만 보였다. 하지만 생리학적으로 의미가 있는 낮은 농도 ( < 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 에서 AgNP의 적혈구 독성 연구는 잘 알려져 있지 않았다.

본 연구는 AgNP에 의한 적혈구의 PS 노출, ROS 생성 및 세포 내 칼슘 증가와 관련하여 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성화에 영향을 미칠 수 있는지 조사했다. 쥐 정맥 혈전증 모델을 사용하여 생체 내 혈전증에 대한 AgNP의 효과를 조사 하였다. 과응집상태 (hypercoagulable state)로 쉽게 혈전 위험을 받을 수 있는 암환자에서 AgNP의 혈전 위험을 다루기 위해 백혈병 환자에서 새로 분리 된 적혈구에 대한 AgNP의 혈액 응고 촉진 효과에 대해 조사하고 자체 혈전 효과가 있는 화학 요법 약물 (파클리탁셀, PTX)과의 시너지를 평가했다.

## II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진

용혈성 빈혈 (HA)은 적혈구 용혈과 관련된 주요 병태 생리 현상 중 하나로서 sickle cell disease과 thalassamia와 같은 비정상적인 적혈구과 관련된 유전성 질환에서 관찰된다. 특히 의약품, 약초 요법, 독소 및 중금속을 포함한 적혈구의 완전성에 영향을 미치는 다양한 화학물질에 의해 발생할 수 있다.

흥미롭게도 여러 화학물질에 의해 유발된 용혈성 빈혈에서 과 응집 상태는 종종 관찰되며, 이러한 환자에서 혈전은 주요 합병증으로 알려져있다. 이는 적혈구가 역할을 할 수 있는 용혈과 혈전 사이의 가능한 연결을 제안한다. 용혈을 유발하는 여러 화학물질은 혈전위험이 증가됨이 알려져 있지만 그 원인에 관하여는 연구된 바 없다.

본 연구에서는 우리는 용혈 활성이 있는 물질 인 ginsenoside Rg3 를 in vitro 와 in vivo 에서 HA 와 혈전증 사이의 연관성을 밝히고자 한다. 용혈이 나타나지 않고 적혈구의 PS 노출로 인한 혈전위험이 보고되어 있는  $Pb^{2+}$ 를 대조군으로 선택하여 Rg3 과 비교하면서 연구를 진행하였다. 용혈로 인해 적혈구는 irregular debris 가 형성되며 이러한 debris 는 PS 노출로 혈전을 일으킬수 있다. 따라서 용혈이 혈전을 일으키는 원인을 밝혔다.

# 실 험 방 법

## I. 시약

AgNP (silver nanoparticles, < 100 nm particle size, contains PVP as dispersant, 99.5 % trace metals basis.), AgMP (silver microparticles, 5–8 micro,  $\geq$  99.9 % metals basis), Lead(II) acetate, Rg3, quinine hydrochloride, mercury orange, trolox, L-ascorbic acid, glutaldehyde solution and osmium tetroxide, the ATP bioluminescent assay kit, purified human thrombin 등의 시약은 모두 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

Phycoerythrin-labeled monoclonal mouse anti-human CD235a, fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled annexin V (annexin V-FITC) 는 BD Pharmingen (San Diego, CA)로부터 구입하였다. Fluo-4 acetoxymethyl ester (fluo-4 AM), the chloromethyl derivative of 2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA) 은 Life Technologies로부터 구입하였다. Technologies.1-Palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phospho-L-serine (C<sub>6</sub>-NBD-PS), 1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (C<sub>6</sub>-NBD-PC) 은 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)로부터 구입하였다. Caspase-3 detection kit I (FITC-DEVD-FMK),

Caspase-3 inhibitors (Z-DEVD-FMK, Z-DQMD-FMK, Z-VAD-FMK, Q-VD-OPh) 은 Calbiochem® from Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. Purified human prothrombin, factor Xa and factor Va 은 Hematologic Technologies, Inc. (Essex Junction, VT)로부터 구입하였다. S2238 은 Chromogenix (Milano, Italy)로부터 구입하였다. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), the endothelial cell growth media (EGM) kit 은 Lonza로부터 구입하였다. Prothrombin time (PT) reagent, activated partial thromboplastin time (aPTT) reagent 은 Instrumentation Laboratory (Bedford, MA), thromboplastin (Simplastin Excel) 은 Biomerieux (Durham, NC)로부터 구입하였다.

## II. 적혈구의 생화학적 변화 및 기전 연구에 관한 측정

### - 적혈구 분리

서울 대학교 건강 서비스 센터 윤리위원회의 승인을 받아 산성 구연산 텍스 트로 오스 (acid citrate dextrose, ACD)와 21 게이지 바늘 (Becton Dickinson, Becton Dickinson)을 사용하여 건강한 남성 기증자 (20-30 세)로부터 혈액을 채취하였다. 얻은 혈액을 200 g 에서 15 min 간 원심 분리하여 platelet rich plasma 와 buffy coat 를 제거하였다. 남은 적혈구 잔사를 phosphate buffered saline (PBS: 1.06 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 154 mM NaCl and 2.96 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  at pH 7.4) 로 2 번, Ringer

solution (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 32 mM HEPES, 5 mM glucose, pH 7.4)으로 1 번 세척하였다. Ringer solution 으로 적혈구 수가  $5 \times 10^7$  cells/mL 이 되도록 재현탁 시킨후 CaCl<sub>2</sub> 가 1 mM 이 되게 하여 실험에 사용하였다. 적혈구 수는 광학현미경에서 hemacytometer 를 사용하여 세었다.

암환자에서의 은나노 평가를 위하여 서울 대학교 병원 보건 서비스 윤리위원회 승인 받아 ACD 와 21 게이지바늘 (Becton Dickinson, Becton Dickinson)을 사용하여 leukemia cancer 남성 기증자 (25 - 45 세)로부터 혈액을 채취하였다. 적혈구 분리는 위와 같은 방법으로 분리하여 실험을 진행하였다. 암환자에 관한 자세한 정보는 table 1 에 기록되었다.

#### **- 은나노의 *Charaterization***

AgNP와 AgMP는 모두 Sigma Aldrich에서 구입하였다. AgNP 현탁액의 제조는 (Jun, E.-A., et al. 2011)에서 기술 된 방법.에 따라 수행되었다. AgNP 또는 AgMP 분말을 100 X 저장 용액 (1 내지 50 mg / mL)으로 증류수에 분산시키고, 최대 출력, 200 Watts (Branson Soniffer, Danbury, CT)를 갖는 탐침 유형 소니 케이 터로 2 분 동안 초음파 처리하여 입자 자기 조립 (응집). 또한, 모든 실험 이전에, AgNP 현탁액을 30 초 동안 격렬히 교반 하였다. 본 연구에서 사용 된 AgNP는 PVP가 분산제 (Sigma Aldrich에서 제공)로 0.2 % PVP가

들어있고 AgMP (Sigma Aldrich에서 제공)에 PVP는 없다. 수학적 계산을 통해 10 ug/mL AgNP 처리 군에는 0.2 ug/mL PVP가, 100 ug/mL AgNP 처리 군에는 2 ug/mL PVP가 존재한다. PS 노출에 대한 AgNP에서의 PVP의 효과를 평가하기 위해, 우리는 RBC의 PS 노출에 2 ug/mL PVP의 단독효과를 측정 하였다. 결과는 다음과 같다 : 대조군 ( $1.52 \pm 0.90$  % PS 노출); 2 ug/mL PVP ( $1.38 \pm 1.46$  % PS 노출). PVP는 PS exposure 효과가 없기 때문에 본 연구에서는 DW를 대조군 컨트롤로 사용합니다.

AgNP의 특성 규명을 위해 AgNP 현탁액을 건조시키고 주사 전자 현미경 (SEM) (ZEISS, MERLIN Compact)으로 관찰하여 크기 분포를 조사 하였다. AgNP의 사이즈는 SEM으로 찍은 여러 이미지에서 입자를 수동으로 윤곽을 잡아서 통계 분석은 무작위로 118 개의 나노 입자로 절차를 수행하였다. 다음 측정에서는 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 입자 농도로 사용하였다. 동적 광산란 (DLS-7000) 및 전기 영동 광산란 (ELS Z-100)에 의해 나노 입자의 유체 역학적 직경 및 제타 전위를 측정 하였다. 모든 경우에서 다분산지수 (PDI)는 0.3 이하였다. 용해 된 은이온 측정을 위해, Ag의 정량화 이전에 초 원심 분리기 (13,000 rpm, 10 분) 및 투석 (24 시간)을 수행 하였다. 투석 실험은 은 나노 입자 분산액 (100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) 5 mL과 물 495 mL로 채워진 투석 병에서 수행되었다. 은의 농도는 유도 결합 플라즈마 질량 분석기 (ICP-MS)로 측정 한 결과  $<0.1 \mu\text{g/L}$ 이었고, 검출 한계는  $0.1 \mu\text{g/L}$ 였다. 즉, 은 나노 입자 분산액에서 최대 0.01 %의 은이온이 노출된다.

#### - 투과 전자 현미경(TEM)을 이용한 적혈구에 의한 AgNP uptake

적혈구에 의한 AgNP 의 세포 내 섭취를 검출하기 위해, 분리 된 적혈구를 AgNP 와 함께 4 시간 동안 배양하고 냉장고에서 2 % 글루타르 알데히드 용액으로 밤새 고정시켰다. 2 일째, 0.05 M 나트륨 카코딜 레이트 완충액으로 10 분 간격으로 3 회 세척 한 후, 세포를 2 % 오스뮴 테트 록 시드로 2 시간 동안 후 고정시켰다. 0.5 % 우라 nil 아세테이트로 30 분간 en-bloc 염색하기 전에 DW 로 간단히 세척 한 후 두 번 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % 및 100 % 에탄올로 3 회 연속 탈수시켰다. 다음으로, 프로필렌 옥사이드를 10 분마다 2 회 전이시키고, 프로필렌 옥사이드 및 스퍼 수지 (1 : 1)로 2 시간 동안 침투시킨 다음 테시 케이 터 내에서 단지 스퍼 레진만을 하룻밤 동안 침투시켰다. 3 일째, 새로 준비한 spurr 의 수지로 2 시간 동안 침투가 완료된 후, 샘플을 중합을 위해 밤새 70 °C의 오븐에 보관 하였다. 마지막으로, TEM (JEOL, JEM 1010) 에서 샘플을 관찰 하였다.

#### - Flow cytometry를 이용한 적혈구 phosphatidylserine (PS) 노출 측정

Annexin V-FITC는 PS 검출 용 마커로 사용되고 anti-glycophorin A-PE는 RBC의 idenfier로 사용되었다. Annexin V 결합에 대한 음성 대조군을 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> 대신 2.5 mM EDTA 존재하에 annexin V-FITC로 염색 하였다. 488 nm에서 방출하는 아르곤 이온 레이저가 장착 된 유동 세포 계측기 FACS Calibur (Becton Dickinson, U.S.A.)에서



샘플을 분석 하였다. 광산란 및 형광 채널을 로그 스케일로 설정 하였다. 5,000 counts의 데이터를 수집하고 Cell Quest Pro 소프트웨어를 사용하여 분석했다. MV는 1 $\mu$ M 표준 비드에 의한 보정 후 전방 산란 특성에 기초하여 동정되었다. 용혈은 분광 광도계로 540 nm에서 측정 하였다.

#### - 공 초점 (confocal) 및 주사 전자 현미경 (SEM)을 사용한 적혈구 모양 관찰

공 초점 현미경을 이용하여 적혈구를 관찰하기 위하여 500  $\mu$ L RBCs 현탁액을 chamber coverslip (Lab-Tek, Nalge Nunc Inc., Naperville, IL)에 1 시간동안 부착하였다. 2 % BSA 링거 용액으로 커버 슬립을 한 번 세척 한 후, chemical 를 트릿하였다. 그후 1 번 세척하고 차광조건에서, anti-glycophorin-A-PE 로 30 분 동안 염색 하였다. 샘플을 한 번 세척하고 재현탁하여 아르곤 레이저 (Leica, Wetzlar, Germany)가 장착 된 공 초점 현미경을 사용하였다. Excitation 및 emission 필터는 각각 488 nm 및 550-600 nm 로 설정되었다.

SEM 관찰을 위해, 4  $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 2 % 글루 타르 알데히드 용액으로 고정시킨 후, RBC 를 원심 분리하고 PBS 로 3 회 세척 한 후 1 % 오스뮴 테트라 옥사이드로 실온에서 30 분 동안 후드 고정시켰다. PBS 로 2 회 세척 한 후, 샘플을 50, 70, 80, 90 및 100 % 에탄올로 연속적으로 탈수시켰다. 건조 및 금 코팅 후, SEM 상에 화상을 관찰

하였다.

#### - 적혈구의 셀 내 *reactive oxygen species (ROS)* 측정

ROS 생성을 검출하기 위해, 적혈구를 37 °C에서 30 분 동안 5  $\mu$ M CM-H2DCF-DA 를 적재 하였다. 과량의 CM-H2DCF-DA 를 제거하기 위해 1 mM  $\text{CaCl}_2$  를 함유 한 링거 용액으로 세척 한 후, chemical 를 처리하였다. 분취 액을 희석 (1:9 in Ringer solution with 1 mM  $\text{CaCl}_2$ )하고, 세포 내 DCF 의 형광을 유동 세포 계측법을 사용하여 측정 하였다.

#### - 적혈구의 셀 내 *glutathion (GSH)* 측정

적혈구내 GSH level 측정은 Jose Enrique O'Connor et al (O'Connor, Kimler et al., 1988) 에서 기술 된 방법에 따라 측정되었다. Chemical treatment 후, RBCs 를 40  $\mu$ M mecury orange (아세톤에 용해)로 처리 한 다음 ice 에서 정확히 5 분 동안 반응시켰다. 그 후, 세포를 세척하고 차가운 링거 용액으로 재현탁한 다음 콜드 링거 용액으로 희석하여 FACS Calibur (BD Biosciences)로 분석 하였다.

#### - 적혈구의세포 내 *ATP* 측정

Chemical treatment 후, 샘플을 세척하고 1 mM  $\text{CaCl}_2$  함유하는 링거 용액에 재현탁시켰다. 상기 분취 액을 10% 트리클로로 아세트산을

함유하는 TAE 완충액 (100 mM Tris- 아세트레이트, 2 mM EDTA, pH 7.8)과 격렬하게 혼합 한 후, 얼음에서 20 분 동안 냉각시켰다. 샘플을 원심 분리하고, supernatant를 차가운 TAE 완충액과 mix하였다. 세포 내 ATP 수준은 ATP 분석 키트를 사용하여 Luminoskan (Labsystems, Franklin, Massachusetts)에서 기재된 luciferin/luciferase assay방법으로 측정 하였다. ATP level은 ATP standard curve에 따라 계산했다.

#### - 적혈구의세포 내 칼슘 농도의 측정.

세포 내 칼슘 증가는 flow cytometry 로 측정하였다. 적혈구 현탁액을 37 °C에서 1 시간 동안 3  $\mu$ M Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)으로 미리 loading 하였다. 과량의 Fluo-4 AM 을 세척시킨후, chemical 과 반응시킨다. 분취 액을 희석(1:9 in Ringer solution with 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) 시키고 FACs 로 분석 하였다. Cell Quest Pro 소프트웨어 (Becton Dickinson)를 사용하여 5,000 counts 데이터를 수집하고 분석했다.

#### - 적혈구의 셀내 caspase-3 활성 측정

Chemical incubation후 FITC-DEVD-FMK를 300 $\mu$ L RBC 현탁액에 30 분 동안 (37 °C, 1000rpm, dark) 반응시킨 후 원심 분리 (1000 g, 5 분)하고 두 번 세척 하였다. 마지막으로, 세포를 500  $\mu$ L 세척 완충액에 재현 탁하고 유동 세포 계측법을 사용하여 검출 하였다. 5,000 counts

데이터를 수집하고 Cell Quest Pro 소프트웨어 (Becton Dickinson)를 사용하여 분석했다. 역할 확인을 위해 40  $\mu$ M의 Z-DEVD-FMK, Z-DQMD-FMK, Z-VAD-FMK 와 10  $\mu$ M의 Q-VD-Oph를 1 시간 미리 처리하고 chemical 과 반응시켜 PS 노출을 확인하였다.

#### - *Scramblase* 및 *flippase* 활성 측정

Chemical incubation 한 적혈구를 30 분 동안 0.5  $\mu$ M C6-NBD-PC 또는 C6-NBD-PS와 반응시킨다. 세포 현탁액의 분취 액을 지시 된 시간 간격으로 제거하고 1 % 소 혈청 알부민 (BSA)의 존재 또는 부재하에 ice에 20 분 동안 반응시킨다. 12,000 g에서 1 분간 원심 분리한 후 얻은 RBC pellets을 1 % Triton X-100에서 용리하고 형광 강도를 측정 하였다 (ex 485 nm, em 535 nm). 내재화 된 프로브의 양은 역 추출 전후의 세포와 관련된 형광 강도를 비교함으로써 결정되었다.

### III. 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성 및 내피 세포와의 부착 측정

#### - *Prothrombinase* 활성 측정

Chemical incubation 후, 적혈구 현탁액 5  $\mu$ L (2mM  $\text{CaCl}_2$ )를 5 nM factor Xa, 10 nM factor Va in Tyrode buffer (134 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM glucose, 2.9 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 12 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.34 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.3 % BSA, and 2 mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 7.4) 와

혼합하여 3 분간 배양한 후 2  $\mu$ M prothrombin 를 가하여 thrombin 생성을 유도하였다. 정확히 3 분간 반응시킨 후 혼합액 10  $\mu$ L 를 미리 준비한 stop buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, and 2 mM EDTA at pH 7.9)에 가해 반응을 종결시킨다. 반응이 종결된 샘플을 원심 분리시켜 얻은 상등액을 취하여 thrombin 생성 정도를 측정하였다. Thrombin 활성은 chromogenic substrate S2238 (chromogenic substrate for thrombin; Chromogenix, Milano, Italy) 을 이용하여 측정하였다. 샘플 100  $\mu$ L 와 2 mM S2238 50  $\mu$ L 를 3 분간 반응시킨 후 50% acetic acid 로 반응을 종결시킨 다음 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

#### - 적혈구의 혈관 내피 세포 부착 측정

HUVEC (6-8 passages)는 내피 세포 성장 배양 키트에서 37  $^{\circ}$ C, 95% air/ 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 유지되었다. 내피 세포 (1x10<sup>5</sup> 세포)를 25T 플라스크에 5 일 동안 시딩하고, chemical와 incubation한 적혈구를 1 회 세척하고 EBM-2에 5x10<sup>7</sup>cells/ML로 재현탁 시켰다. HUVEC을 EBM-2로 두 번 세척 한 후, chemical에 노출 된 적혈구를 HUVEC와 37  $^{\circ}$ C에서 60 분간 배양 하였다. 배양 후, 플라스크를 EBM-2로 3 회 세척하여 비 부착 적혈구를 제거 하였다. 부착 성 적혈구의 수를 광학 현미경으로 계수 하였다. 실험은 3 회 실시되었으며, RBC 수를 세는 데 무작위로 25 개 필드를 선택했다.

#### - 형광현미경으로 적혈구의 혈관 내피 세포 부착 관찰

내피 세포 ( $2 \times 10^4$  cells)를 4-well-chamber 에 2 일 동안 배양하고 calcein green 으로 20 분 동안 염색 하였다. Chemical incubation 된 적혈구를 한 번 세척하고 EBM-2 에  $5 \times 10^7$  cells/mL 로 재현탁 시켰다. HUVEC 를 EBM-2 로 두 번 세척 한 후, chemical treated 적혈구를 HUVEC 와 37 °C에서 60 분간 함께 배양 하였다. 배양 후, 챔버중 비 부착 적혈구를 제거하기 위해 EBM-2 로 한번 세척하고, RBC 를 염색하기 위해 glycophorin-A-PE 를 첨가 하였다. 형광 현미경을 사용하여 HUVEC 에 부착 된 적혈구를 관찰 하였다.

#### IV. 혈소판 실험

150g 15 분 동안 원심 분리하여 platelet rich plasma (PRP)을 얻고, 2,000g 20 분 동안 원심 분리하여 PRP 의 침전 된 분획으로부터 platelet poor plasma (PPP)을 얻었다. PRP 의 혈소판 수는 PPP 를 사용하여  $3 \times 10^8$  platelets/mL 로 조정 하였다. PPP 에서 PT 와 aPTT 는 각각 PT 와 aPTT 시약 키트의 절차에 따라 BBL 광도계 (Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland)에서 측정되었습니다. PRP 에서 혈소판 응집은 100 %가 PPP 의 흡광도로 보정되고 0 %가 PRP 의 흡광도로 보정 된 응집 계 (Chrono-log Corp., USA)의 광 투과율로 측정되었습니다.

혈소판의 혈액 응고 촉진 활성을 측정하기 위해, 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 를 포함하는 suspension buffer 을 사용하여 chemical-treated PLT 를  $1 \times 10^7$  PLTs/mL 로 희석하였다. 상기 한 바와 같이 프로트롬빈나제 검정을 사용하여 혈소판에 의한 트롬빈 생성을 측정 하였다.

## V. 동물 실험

### - 실험 동물 및 적혈구 분리

생체 내 실험에 사용 된 모든 프로토콜은 서울 대학교 동물 서비스 센터 윤리위원회의 승인을 받았습니다. 체중 300-400 g의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 (SamTako, Osan, Korea)를 사용하였다. Bridge study로 rat RBC로 실험을 하기 위하여 흰쥐를 diethyl ether로 마취한 다음 개복하여 복대 동맥으로 부터 채혈하였다. 이때 항응고재를 ACD로 사용하며 혈액과 1:6 의 비율로 되게 하였다. 적혈구 분리 방법은 사람 적혈구 분리 방법과 동일한다.

*In vivo* hemolysis, PS exposure, thrombin generation, thrombus formation등 실험을 위하여 흰 쥐를 우레탄 (1.25 g / kg, i.p.)으로 복상 내 주사하여 마취를 유도한 다음 좌측 대퇴 정맥에 pe 60 도관을 삽입하고, 도관을 통하여 Chemical를 투여하였다.

### - 용혈 및 적혈구 fragility 측정

*In vivo* hemolysis 를 측정하기 위해 위와 같은 방법으로 투여, 마취하고 일정한 시간 후에 복대동맥 채혈법으로 혈액을 채취하였다. 항응고제는 3.8% sodium citrate 를 사용하였다. Hemolysis 는 분광광도계로 540 nm 에서 측정 하였다. Chemical treated 한 RBC fragility 는 0.45 % NaCl 에서 분광 광도계로 540 nm 에서 측정되었다.

#### - 흰 쥐 적혈구에서의 PS 노출 측정

PS 노출 확인을 위해 위와 같은 방법으로 투여, 마취하고 일정한 시간 후에 복대동맥 채혈법으로 혈액을 채취하였다. 항응고제는 3.8% sodium citrate를 사용하였다. 얻어진 혈액을 binding buffer (10 mM HEPES-Na, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.0 mM dextrose, 5 mg/ml BSA, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 에 1:200의 비율로 가하여 희석한 후 annexin V-FITC, rat RBC identifier를 차광조건에서 20분간 염색하였다. Annexin V결합에 대한 음성 대조군은 EDTA 5 mM로 Ca<sup>2+</sup>을 chelation 시킨 샘플을 사용하였다. 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> 유무의 binding buffer로 희석한 후 flow cytometry로 측정하였다.

#### - 정맥 혈전 생성 실험

흰 쥐를 우레탄 (1.25 g / kg, i.p.)으로 복강 내 주사하여 마취를 유도한 다음 좌측 대퇴 정맥에 PE 60 도관을 삽입하고, 도관을 통하여



Chemical를 투여하였다. 개복하여 하대 정맥을 노출시키고, 주변 지방 조직을 조심스럽게 제거한 후, 주변의 작은 혈관들을 모두 묶어 흐름을 차단하였다. 다음으로 하대 정맥에 16 mm간격으로 매듭을 느슨하게 준비하여 stasis를 유발 할수 있도록 하였다. 약물 투여 일정한 시간 지난 후, saline에 500 배 희석한 thromboplastin-D를 infusion하면서 30초 간격으로 위쪽과 아래쪽의 매듭을 차례대로 묶음으로써 stasis 를 유도하였다. 복강을 다시 덮고 혈전 생성을 유도한 다음 15 분후, 복강을 열고 묶어진 혈관을 절제했다. 혈관을 세로로 열어 생성된 혈전을 분리한 다음, saline으로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 혈전의 질량을 측정하였다.

## VI. 통계처리

실험결과는 mean  $\pm$  SE 으로 표시하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test 또는 two-way anova (Duncan' s multiple range test)를 실시하여 유의성을 검증하였다. 유의적인 차이는 p value of < .05 이하인 경우에 인정하였다.

# 실험 결과

## I. AgNP의 혈전 생성 촉진

### *I-1. AgNP의 characterization 및 적혈구에 의한 AgNP 세포 흡수*

본 연구에서 은나노(AgNP)의 크기 분포는 전자 현미경 (SEM)을 사용하여 특성화되었다. AgNP의 크기가 100 nm 미만이었으며, 계산된 평균 입자 직경은 약 49.3 nm였다 (Figure 1a).

AgNP의 peak size by intensity는 125.4 nm이었다 (도 1b). 또한 AgNP의 zeta potential는 pH 7.4에서 -32.07 mV였다. 울트라 원심 분리기 (13,000 rpm 10 분) 및 투석 (24 시간) 후 유도 결합 플라즈마 질량 분석법 (ICP-MS)을 사용하여 이온화된 은을 분리하고 정량하였으며, 이온은 아주 미량이었다 (0.01 % 미만). 또한, 이온의 함량은 4 시간 또는 24 시간 처리 후 PS 노출이 없는 것으로 조사되었다 (Supplemental Figure 1). AgNP 및 AgMP의 물리 화학적 특성은 Supplemental Table 1에 요약되어 있다.

AgNP가 적혈구로 uptake되는지 여부를 조사하기 위해, 우리는 투과 전자 현미경 (TEM)을 사용하여 적혈구에 의한 AgNP의 세포 흡수를 측정해보았다. TEM 이미지에서는 농도 의존적으로 적혈구에 의한 AgNP의 uptake가 보인다. 특히, 높은 농도의 500 µg/mL AgNP를 처리시 적혈구의 damage 와 용혈 현상이 나타났다. 이러한 결과는 다른

연구에서 보인 높은 농도의 AgNP로 인한 용혈과 유사하다. 또한 낮은 농도인 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 AgNP uptake가 유의하게 증가한다 (Figure 1c). AgNP와 달리 AgMP은 고농도에서도 용혈이 나타나지 않았다 (Figure 1).

### *I-2. AgNP에 의한 적혈구 변화 및 셀 내 기전 연구*

AgNP 각 농도에서의 용혈 정도는 분광 광도계로 검출되었다 (Figure 2). AgNP는 TEM 이미지와 일치하는 고농도 (각각 250 및 500  $\mu\text{g/mL}$ )에서 약 11.9 % 및 43.1 %의 용혈을 유도하여 고농도 ( $> 250$   $\mu\text{g/mL}$ ) AgNP는 용혈을 유도 할 수 있음을 나타낸다 (Figure 2). AgNP와는 반대로, 은마이크로 (AgMP)는 최대 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서도 용혈을 유도하지 않았다. 이는 Ag 입자의 크기가 용혈 효과에 대해 중요하다는 것을 반영한다.

낮은 농도의 AgNP ( $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$ )는 용혈을 유발하지는 않았지만, TEM 관찰을 통해 AgNP는 적혈구에 의한 세포 흡수를 나타냄으로 낮은 농도의 AgNP에 의한 적혈구에서 용혈이 아닌 다른 독성 효과가 유발 될 수 있음을 시사한다. 첫째, 우리는 정맥 혈전증에 중요한 역할을 하는 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성을 조사했다. 유세포분석 (flow cytometry)결과를 보면, AgNP 농도 및 시간 의존적으로 PS 노출도 증가했다 (Figure 3a, b). MV 생성은 또한 AgNP에 노출시 관찰되었다 (Figure 3c). 또한, AgNP 4 시간 처리시 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ 의 유효 수준과 비교하여 더 긴 노출 시간에서 보다 더 낮은 유효 수준이 관찰 할수

있다. Supplemental Figure 2에서 볼 수 있듯이 24 시간 처리시 1  $\mu\text{g/mL}$  은나노는 30%의 PS노출을 유도하며 이는 4시간 처리시 유효수준보다 100배 줄어들었다.

공 초점 현미경 (Confocal) 및 SEM 관찰 결과, AgMP가 효과가 없는반면 (Figure 4a, b), AgNP에 노출되면 spiny RBC, 즉 echinocytes 가 100  $\mu\text{g/mL}$  (4 시간)에서 보였다. 인지질 비대칭의 소실은 적혈구의 형태 학적 변화에 기인 한 것으로 알려져있다. 이 과정에서 PS는 외부 막으로 노출 될 수 있으며 세포막 표면은 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성화와 밀접한 관련이 있는 MV가 생성됨에 따라 손실다. AgNP와 달리 AgMP은 적혈구에 용혈, PS 노출 또는 MV 생성, 형태 변화 (Figure 1-4)등 어떠한 영향도 끼치지 않았다.

Oxidative stress는 적혈구의 PS 노출 및 MV 생성을 유도 할 수 있으며, 이는 적혈구의 응고 촉진 활성을 촉진시킬 수 있다. Flow cytometry 의 결과에 따르면, AgNP에 의한 적혈구 ROS 생성은 농도 의존적으로 증가했지만 AgMP에 노출 된 적혈구에서는 아무 변화도 관찰되지 않았으며 (Figure 5a), 이는 Figure 3에서의 PS 노출 및 MV 생성 결과와 일치한다. ROS 생성과 함께 대표적인 세포 내 항산화제인 글루타티온 (GSH)과 ATP는 AgNP에 노출 된 후에 유의하게 감소 되었다 (Figure 5b, c).

Oxidative stress가 intracellular calcium increase를 일으킬 수 있음이 잘 알려져 있으며, 이는 PS 노출과 MV 생성을 유도하는 주요

원인으로 알려져 있다. Intracellular calcium level은 AgNP에 의해 농도 의존적으로 증가한다 (Figure 5d). 이어, increased intracellular calcium은 PS 노출을 담당하는 scramblase의 활성 증가한다 (Figure 5e). 또한, PS inward를 담당하는 flippase를 측정한 결과, 10  $\mu\text{g/mL}$  AgNP에서는 억제 효과를 보이는 반면, 50와 100  $\mu\text{g/mL}$  AgNP에서는 flippase 억제 효과가 거의 보이지 않았다 (Figure 5f). 이는 PS 노출은 주로 scramblase가 주요 역할을 하고 있다고 볼 수 있다. 그러나 형광 표지된 인지질을 사용하는 아미노 전이 효소 활성의 측정은 마커 인지질의 수송과 이들 효소의 상호 간섭을 배제할 수 없으므로 방법론적 한계로 인해 flippase 및 scramblase 활성의 정확한 평가가 저해될 수 있다. AgNP 그룹과 비교했을 때, AgMP 그룹에서는 ROS 생성, GSH 감소, ATP 고갈, 세포 내 칼슘 농도 및 scramblase 활성에 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Figure 5).

AgNP에 의한 PS 노출에서 oxidative stress와 intracellular calcium increase의 역할을 확인하기 위해 항산화제와 칼슘킬레이터인 EGTA에 의한 변화를 조사했다. NAC, 비타민 C, trolox와 같은 항산화제 및 EGTA의 전처리는 AgNP에 의해 유도된 PS 노출을 상당히 감소시켰으며 (Figure 6a, b), 또한 증가된 Intracellular calcium level은 항산화제 NAC으로 인해 억제되었다 (Figure 6c). 이는 공 초점 현미경 및 SEM (Figure 6d, e)에 의해 확인될 수 있으며, ROS와 intracellular calcium increase는 AgNP에 의한 PS 노출의 핵심 기전이 될 수 있다.

### *I-3. AgNP의 PS 노출에 의한 생리학적 의미*

적혈구에 대한 AgNP의 혈전 효과는 thrombin 생성과 인간 체대 정맥 내피 세포 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)에 대한 적혈구의 부착을 조사하여 평가 하였다. 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성화는 thrombin 생성을 촉진하여 이는 혈전에서 중요한 과정이며, 또한 이런 적혈구가 내피 세포에 부착하여 혈전을 유도할 수 있다. AgNP에 의해 thrombin generation는 농도의존적으로 증가함을 보이며 (Figure 7a), 이는 항산화제 NAC, Vitamin C와 trolox에 의해 감소되며(Figure 7b) 또한 칼슘킬레이터 EGTA에 의해 감소함을 보였다 (Figure 7c).

적혈구의 HUVEC 부착작용도 AgNP 농도의존적으로 증가함을 보이고 (Figure 8a), 이는 NAC 와 EGTA의 전처리로 억제됨을 보인다 (Figure 9b). 형광현미경이미지에서도 8c와 같은 억제된 경향성을 보인다 (Figure 8c). 이런 결과는 AgNP에 의한 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성화 및 혈관에 대한 적혈구의 부착을 증가시킬 수 있으며 궁극적으로 혈전증을 촉진시킬 수있다는 것을 보일수가 있다. 또한, 이러한 현상은 모두 항산화제와 칼슘킬레이터에 의해 약화되었으며, PS 노출 및 MV 발생과 유사하게 산화스트레스 및 셀내 칼슘량와의 관련성을 시사한다. 그리고 AgNP 그룹과 비교시, AgMP는 thrombin generation 과 혈관 부착 작용에 유익성이 보이지 않는다.

#### *I-4. AgNP의 in vivo 혈전 평가*

AgNP의 생체성 평가는 rat venous thrombosis model를 사용하였다. 8주령 SD rat 복강 동맥에서 채혈을 하고 적혈구를 분리하여 AgNP에 의한 PS 노출 및 thrombin 생성을 본 결과 모두 농도 의존적으로 증가했다 (Figure 9a, b). 이는 human 적혈구에서 AgNP에 의한 PS 노출 및 thrombin 생성 결과와 같은 경향성을 보인다.

다음으로, In vivo AgNP의 혈전 효과를 평가하기 위해, 0, 10 또는 50 mg/kg의 AgNP를 혈관 내 주사하고 30분간 방치한 후 복강 동맥 채혈을 통해 혈액을 채취하여 flow cytometry로 적혈구 및 혈전 형성의 PS 노출을 평가한 결과 in vivo- PS 노출은 AgNP 농도 의존적으로 증가했다 (Figure 10a). 이는 AgNP가 적혈구의 응고 촉진 활성을 유도하여 결국 정맥 혈전증을 증가시키는 것을 반영하여 thrombus weight 증가와 잘 일치했다 (Figure 10b).

#### *I-5. AgNP와 chemotherapy agents의 시너지 효과 평가 및 암환자 적혈구에서의 AgNP 독성 평가*

AgNP는 암치료시 화학 요법 약물의 케리어로 많이 사용한다. 암을 치료하기 위한 화학 요법 약물은 응고 촉진 효과를 가지며 암 환자에서 증가된 혈전증에 기여하는 것으로 보고된 바 있다. 우리는 AgNP가 적혈구의 응고 촉진제 활성을 유도할 수 있는 잘 알려진 화학 요법 약물인 Paclitaxel (PTX)의 응고 촉진 효과에 시너지 효과를 가질 수 있는지

조사했다. Figure 11a-c에서 볼 수 있듯이 PTX+AgNP에 의한 ROS 생성, PS 노출 및 thrombin 생성은 AgNP 단독 또는 PTX 단독으로 처리 한 것과 비교하여 유의하게 증가시켰다.

또한, AgNP는 질병 치료 및 진단을 위해 암 치료 및 진단에 많이 적용되었지만 암 자체도 혈전증의 잘 알려진 위험 인자다. 암환자에서의 혈전 리스크를 체크하기 위하여 Table 1에서 기재 된 바와 같이 총 13명의 백혈병 남성 환자에서 분리된 적혈구로 AgNP를 처리하여 실험을 진행하였다. 그중 약물 작용을 배제 하기 위하여 약물 복용 이력이 없는 총 6명의 암환자의 적혈구를 분리하여 실험한 결과, AgNP에 의한 PS 노출 및 중요한 역할을 하고 있는 ROS 생성을 촉진하였다 (Figure 12a). 뿐만 아니라 건강한 대조군으로부터의 적혈구의 혈액 응고 촉진 활성화와 비교했을 때 암환자 혈액 샘플에서는 유효 농도가 보다 낮음을 확인했다 (Figure 12b).



## II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진

### II-1. Rg3에 의한 적혈구 용혈 활성 및 형태학적 변화에 미치는 영향

Human 적혈구에  $Pb^{2+}$  과 Rg3를 1시간 동안 처리한 결과, Rg3는 농도 의존적으로 용혈을 유도하지만  $Pb^{2+}$ 에서는 아무런 변화도 없다. 특히 20  $\mu M$ 의 Rg3는 > 50%의 용혈이 나타난다 (Figure 13a). 시간 의존적인 용혈 결과에서는 Rg3 20  $\mu M$ 에서는 유의하게 용혈을 증가시켰다 (Figure 13b).

Human 적혈구에  $Pb^{2+}$  과 Rg3를 4시간 동안 처리하여, 공 초점 현미경 (confocal microscope) 으로 관찰한 결과,  $Pb^{2+}$ 은 정상적인 discocytes에서 echinocytes로 변화되면서 농도가 높아지면 점차 spherocytes로 발전된다. 4시간 10  $\mu M$  Rg3 (hemolysis 약 10%)를 처리시 적혈구 세포막 표면에서는 pore formation이 형성되며 20  $\mu M$  Rg3는 cell burst를 일으켜 적혈구들이 debris상태로 유도한다 (Figure 14).

주사 전자 현미경 (scanning electron microscope, SEM)을 사용하여 약물에 의한 적혈구 세포 표면의 변화를 시간 의존적으로 (0, 0.5 시간, 1 시간, 4 시간) 관찰한 결과,  $Pb^{2+}$ 과 다르게, Rg3에 의해 적혈구는 세포표면에 pore이 생성되면서 궁극적으로 cell fragmentation 된다는 것을 입증하였다 (Figure 15).

Positive control로 사용한  $Pb^{2+}$ 이 용혈을 일으킬때의 적혈구

모양변화를 확인하기 위하여, 더 높은 용량 및 더 긴 시간의 노출한 결과, 20  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  8시간 처리한 결과 echinocytes, 크기가 작아진 echinocytes, cell size가 작아진 spherocytes 가 관찰되었고,  $\text{Pb}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  (hemolysis 약 50%)에서는 spherocytes가 관찰되었다 (Supplement 1).

## *II-2. Rg3에 의한 intact 와 debris 적혈구의 PS 노출*

PS 노출은 파 응집성을 가진 적혈구를 부여하는 주된 사건으로 제안 되어 왔다. Flow cytometry를 이용하여 세포 크기에 따라 intact RBC, MV 또는 debris을 각각 분석 할 수있다 (Figure 16, left and Figure 18 a, upside).

### II-2-1) Intact RBC에서의 PS 노출

Intact한 적혈구에서의 PS 노출을 보기 위해, 용혈을 현저하게 유도하지 않는 비 용혈 농도 ( $\leq 20 \mu\text{M}$ 의  $\text{Pb}^{2+}$  및 10  $\mu\text{M}$ 의 Rg3)에서 다음 실험을 진행하였다. Rg3에 의한 Intact 적혈구는 거의 없으며 (Figure 16, left) 남은 intact 적혈구의 PS 노출을 분석한 결과 아무런 변화도 보이지 않았다. 이에 비해 positive control로 사용한  $\text{Pb}^{2+}$ 에서는 현저한 증가가 보인다 (Figure 16, right).

적혈구의 PS 노출에 영향을 주는 주요 메커니즘 인 intracellular calcium increase과 caspase 3 활성화는 납에 의해 유의하게 증가했다. 하지만 Rg3 처리 된 적혈구는 세포 내 칼슘 증가 ( $p=0.067$ ) 및

caspase 3 활성화에 유의 한 변화를 보이지 않았다 (Figure 17a, b).  $Pb^{2+}$ 에 의한 PS 노출은 caspase inhibitor (Figure 17c)와 칼슘제거시 (Figure 17d, left) 억제되었고 또한  $Pb^{2+}$ 에 의해 촉진된 caspase 활성화는 칼슘제거시 억제되었다 (Figure 17, right).

### II-2-2) Fragmented RBC (Debris) 에서의 PS 노출

앞에서 얘기한 바와 같이, Intact cell (Figure 16) 및 debris (Figure 18)의 변화는 flow cytometry 히스토그램 분석에서 세포 크기에 따라 각각 분석 될 수 있다. MV와 debris 구역을 분석한 결과, debris는 Rg3 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼수 있으며 이런 debris의 PS 노출도 관찰되었다 (Figure 18a, right). 또한, annexin V-FITC로 노출된 PS와 binding 하며 형광을 나타낼수 있다는 것을 이용하여 형광현미경 관찰에서는 이런 debris는 사이즈와 모양이 서로 다르며 PS는 hemolysis로 인한 debris에 randomly 노출되었다는 것을 보인다. Positive control로 납을 처리한 적혈구에서는 전에 이미 보고된 바와 같이 echinocyte 그리고 spherocytes로 변화되면서 PS노출 및 MV이 보였다. 하여 Rg3는 이미 보고된 납과 서로 다른 경로로 적혈구에 손상을 일으키고 이런 irregular debris는 PS 노출이 보였다 (Figure 18b).

### *II-3. Rg3에 의한 적혈구의 thrombin 생성 및 혈관 부착 작용*

Positive control로 사용한  $Pb^{2+}$ 은 용혈이 나타나지 않았고 thrombin 생성 및 혈관 부착 작용을 촉진 하는 반면, Rg3 는 또한 용혈을 유도하는 용량(20  $\mu M$ 의 Rg3)에서 thrombin 생성을 촉진 시켰으며 (Figure 19a), 이는 용혈이 적혈구에 응혈 활성을 부여 할 수 있음을 시사한다. 또한 Rg3 군에서 용혈이 일어남에 따라 thrombin 생성이 증가하여 Figure 18에 나타난 irregular debris 및 노출 된 PS가 혈전 형성 효과에 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었다. 또한 내피 세포 인 HUVEC에 대한 Rg3 처리한 적혈구 부착 증가의 관찰에 의해 확인되었다 (Figure 19b).

적혈구 뿐만 아니라 혈소판도 혈전을 일으킬수 있다고 잘 알려져 있다.  $Pb^{2+}$ 와 Rg3의 혈전 유도 활성이 혈소판이 아닌 적혈구를 매개한 결과임을 증명하기 위하여, activated partial thromboplastin time (aPTT) 와 prothrombin time (PT), 혈소판 응집(platelet aggregation) 그리고 thrombin 생성 (Supplement 2.)을 측정한 결과 모두 혈소판에 영향을 일으키지 않음을 확인하였다.

### *II-4. 용혈성 활성이 있는 Quinine으로 hemolysis-associated procoagulant activity 평가*

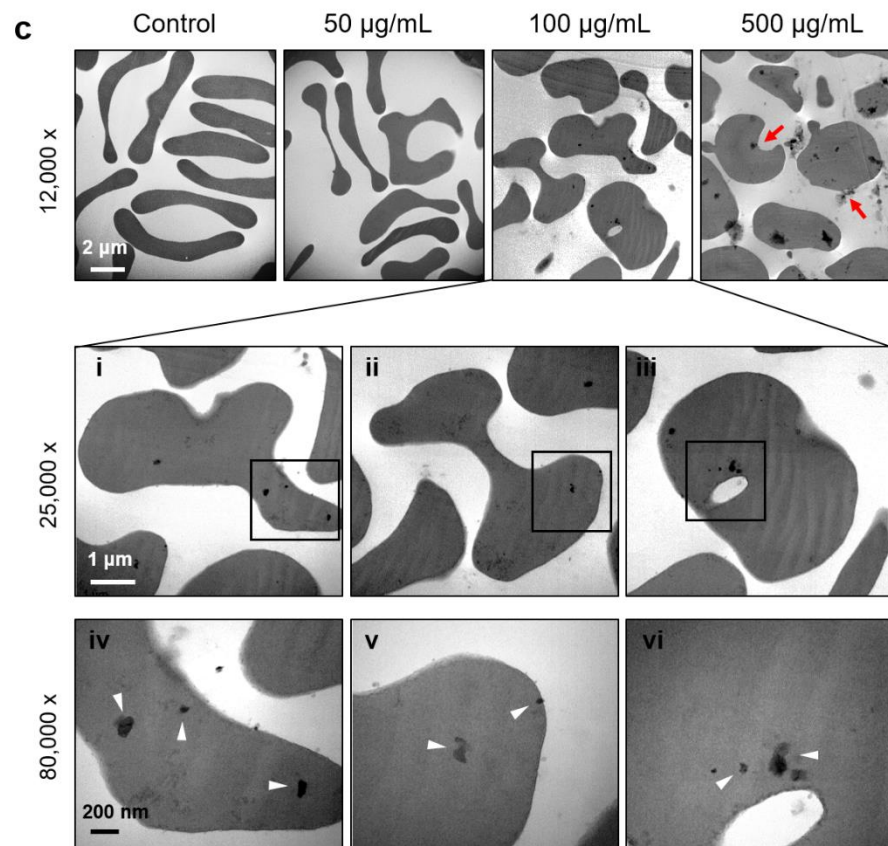
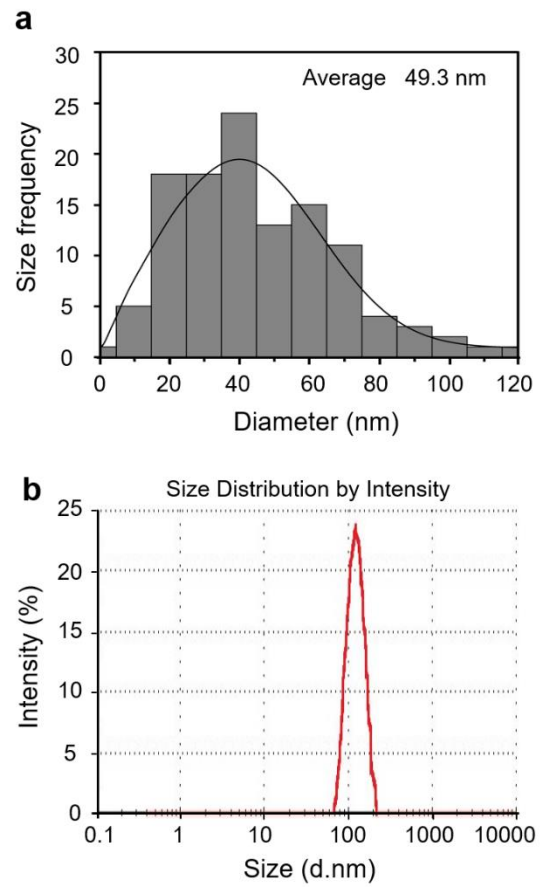
용혈성 작용이 있는 다른 약물에서도 Rg3와 같은 용혈 작용으로 인한 debris의 생성 및 PS-bearing debris가 혈전 독성을 일으킬수

있다는 것을 확인하기 위하여 본 연구에서는 quinine hydrochloride를 선택하여 실험을 진행하였다. Quinine (0, 0.5, 1, 3, 5 mM)을 적혈구에 24시간 처리한 결과, hemolysis는 농도 의존적으로 증가하며 1 mM에서 약 10%의 용혈, 5mM에서는 50% 이상의 용혈현상이 나타났다 (Supplement 3a). 또한 SEM image에서 모양 변화를 관찰한 결과, quinine를 처리한 적혈구의 cell 표면에서는 pore formation이 관찰되었다. 이는 앞에서 얘기한 Rg3에 의한 모양 변화와 흡사하다 (Supplement 3b).

이어, quinine에 의한 적혈구의 PS노출을 확인하였다. 마찬가지로 intact RBC와 fragmented RBC (debris)에서의 PS 노출을 각각 분석해보았다. Intact RBC에서는 intact cell counts가 농도 의존적으로 감소함과 동시에 intact cell에서의 PS노출은 증가하였다. Debris를 분석한 결과, debris counts가 농도 의존적으로 증가하며 debris의 PS 노출도 증가하였다 (Supplement 4a). 또한, quinine에 의한 적혈구 혈액 응고 촉진 활성을 평가한 결과, thrombin 생성이 농도 의존적으로 증가하였다. Quinine는 또한 용혈을 유도하는 용량(1 mM의 quinine)에서 thrombin 생성을 촉진시켰으며 (Supplement 4b), 이는 용혈이 적혈구에 응혈 활성을 부여할 수 있다고 주장한 Rg3의 결과와도 흡사하다. 이러한 결과는 용혈로 인한 irregular debris 및 노출된 PS가 혈전 형성 효과에 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었다.

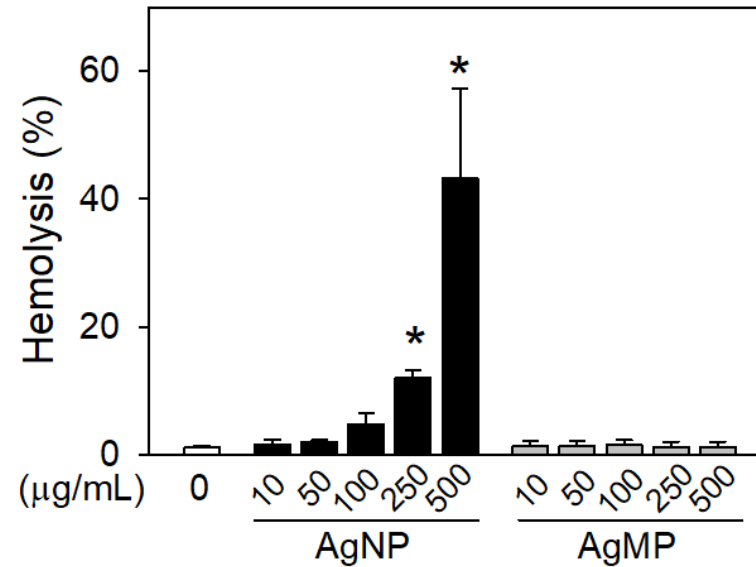
## II-5. Rg3 의 용혈로 인한 혈전독성의 *in vivo* 평가

0, 25 mg/kg의  $Pb^{2+}$  및 0, 25, 50 mg/kg Rg3 을 정맥 내로 투여하고 각각 1시간 및 10분 후 복강 동맥에서 채혈하여 적혈구의 용혈 및 PS 노출을 평가했다. Hemolysis와 Fragility of RBCs in 0.45 % NaCl는 Rg3 농도 의존적으로 증가를 보였다 (Figure 20). Intact RBCs 와 Fragmented RBCs의 PS 노출을 각각 분석한 결과, Rg3을 처리한 intact RBCs에서는 PS 노출이 거의 안보이는 (Figure 21a) 반면 Fragmented RBCs에서는 농도 의존적으로 PS 노출이 심각하게 증가하였다 (Figure 21b). Positive control로 사용한  $Pb^{2+}$ 에서는 *in vitro*의 결과랑 유사하게 용혈 현상이 없고, intact 및 MV 모두 PS 노출이 관찰 되었다 (Figure 20, 21). 정맥내 투여후 procoagulant activity를 조사한 결과에서도  $Pb^{2+}$ 와 Rg3은 모두 thrombin generation을 촉진하였다. 이러한 결과는 *in vitro*와 일치하였다 (Figure 22). 또한 rat venous thrombosis model를 이용하여 thrombus 생성을 확인 한 결과,  $Pb^{2+}$ 을 처리한 그룹은 예상대로 thrombus weight가 증가하였고, 또한 Rg3 처리한 쥐들은 용혈이 타나타는 농도에서도 농도 의존적으로 thrombus weight가 증가하였다 (Figure 23). 이러한 *in vivo*결과는 Figure 19에서 본 *in vitro*결과를 뒷받침 한다.

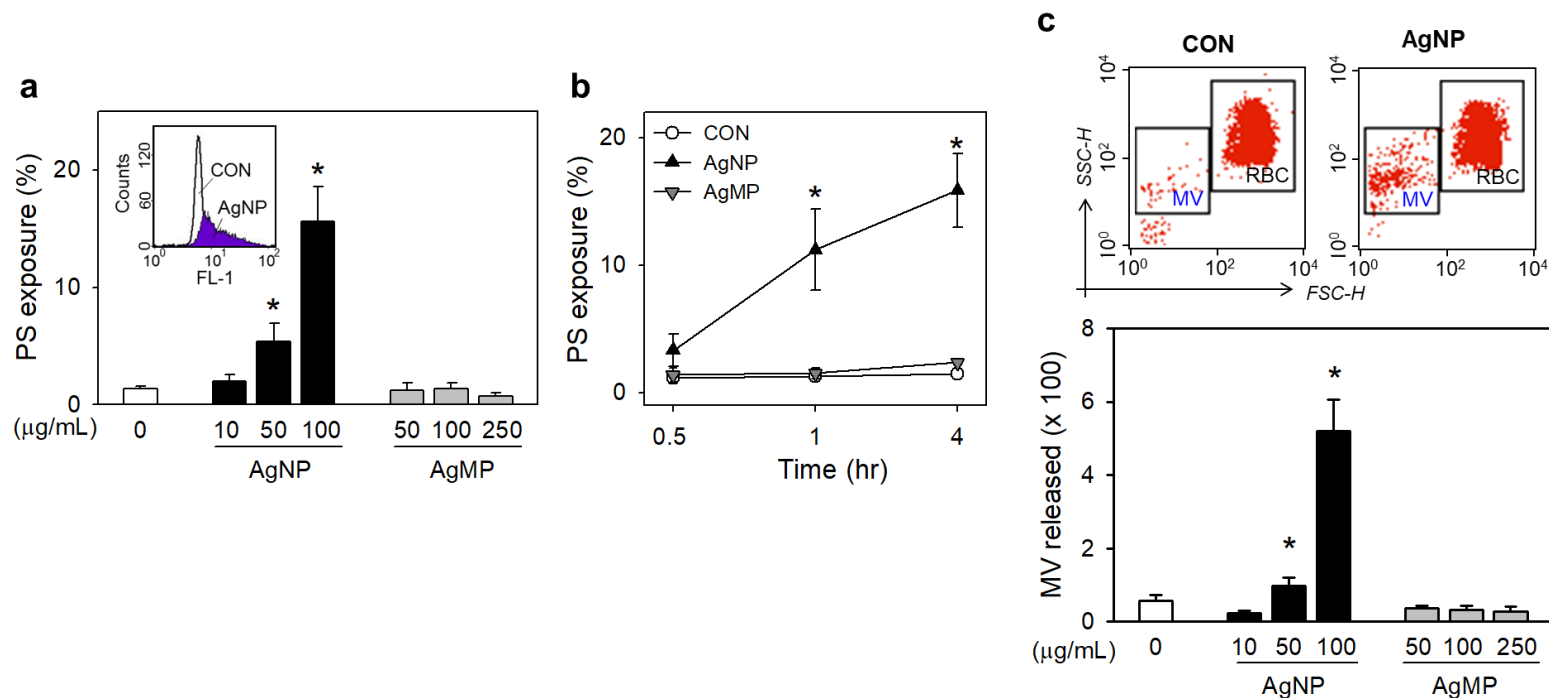


**Figure 1 | Characterization of AgNP and its cellular uptake by RBCs.** (a) The size distribution histogram generated using SEM images showed AgNPs of size between 0 and 100 nm with an average of 49.3 nm. Value are calculated from randomly measuring 118 AgNPs taken by SEM. (b) Particle size distribution of AgNPs in saline suspension used for intravenous injection showing particles of diameter ranging from 32.7 nm to 255 nm, with a peak of distribution at 125.4 nm. The results indicate the presence of silver nanoparticle agglomerates in saline. (c) Cellular uptake of various concentration of AgNPs by RBCs were observed using TEM after 4 hr treatment. The red arrows indicated cell disruption and lysis at 500  $\mu\text{g/mL}$  of AgNPs. Magnification were 25,000 (c, i- iii) and 80,000 (c, iv-vi) for 100  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs. And the white arrows indicated AgNPs uptaken by RBCs (n=4).

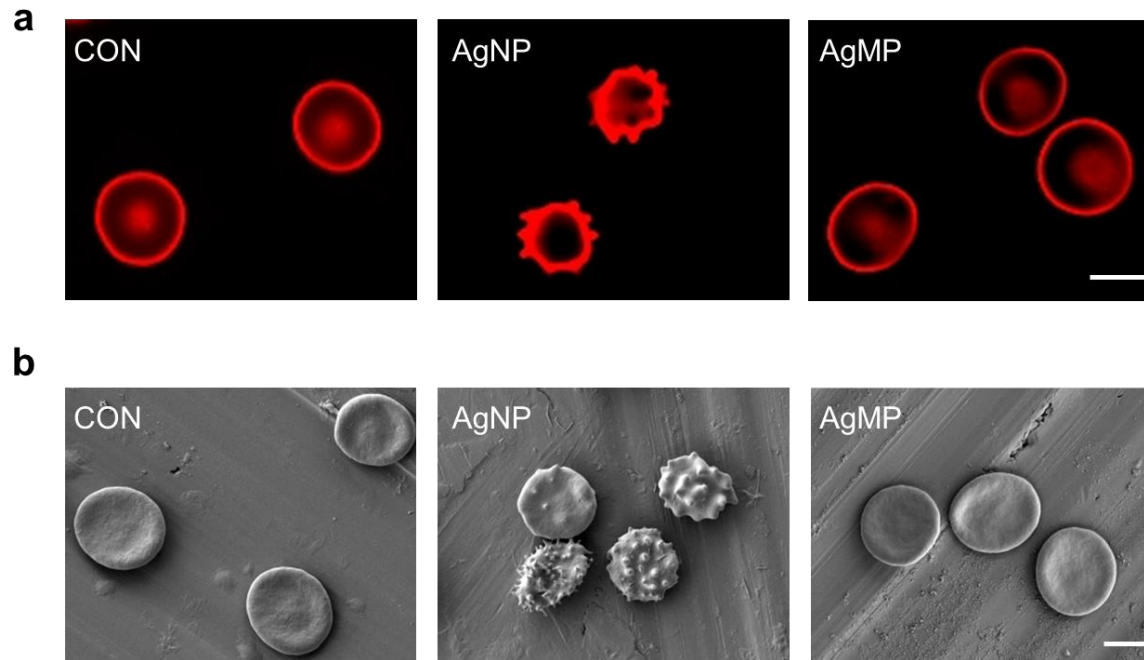




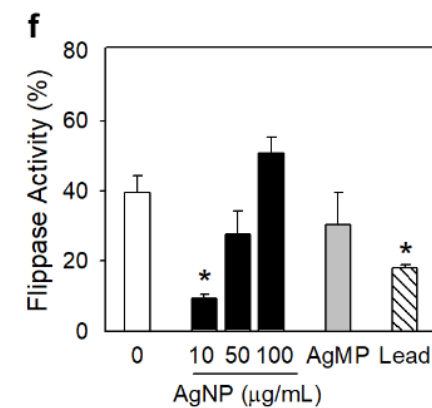
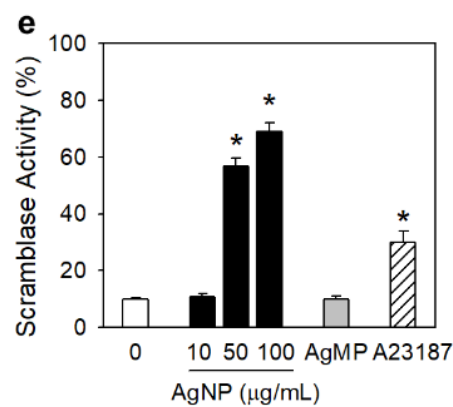
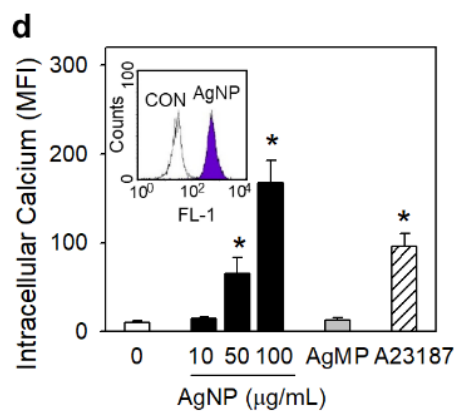
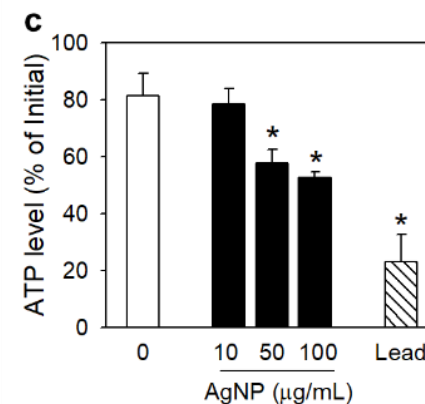
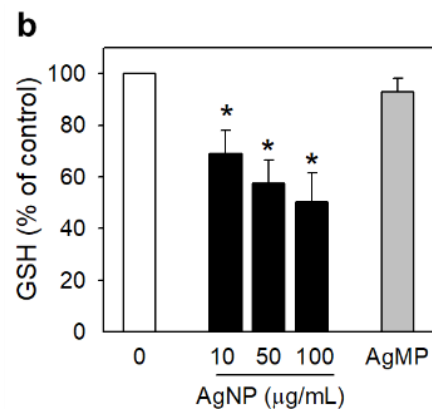
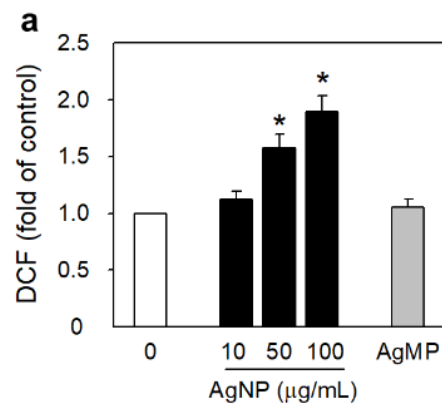
**Figure 2 | Hemolytic responses of human RBCs by AgNP and AgMP.** After RBCs were treated with various concentration of AgNP and AgMP for 4 hrs, hemolysis was evaluated at 540 nm. Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



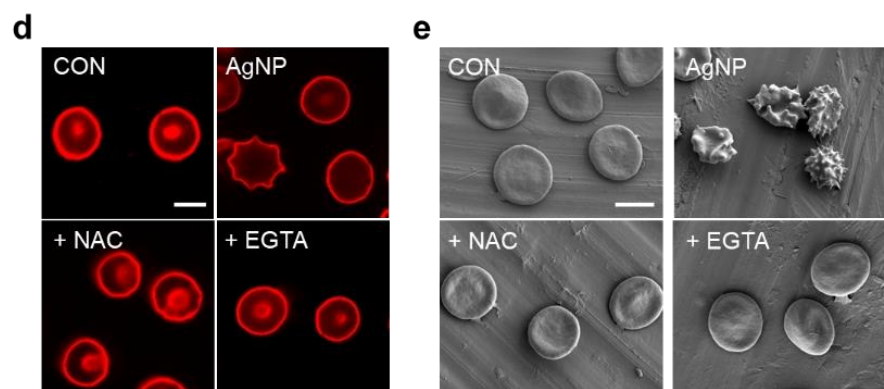
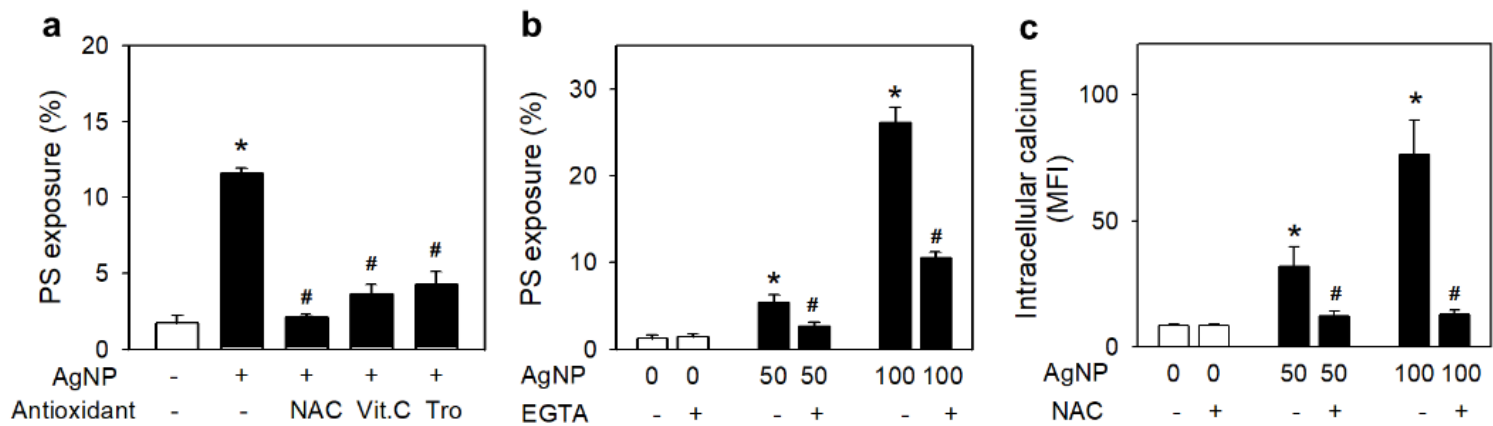
**Figure 3 | Effects of AgNP and AgMP on PS exposure and MV generation of human RBCs.** After RBCs were treated with various concentration of AgNP and AgMP for 4 hrs, (a) concentration- and (b) time- dependent increase of PS exposure as well as (c) MV generation by AgNP and AgMP were all measured using flow cytometry. Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ )



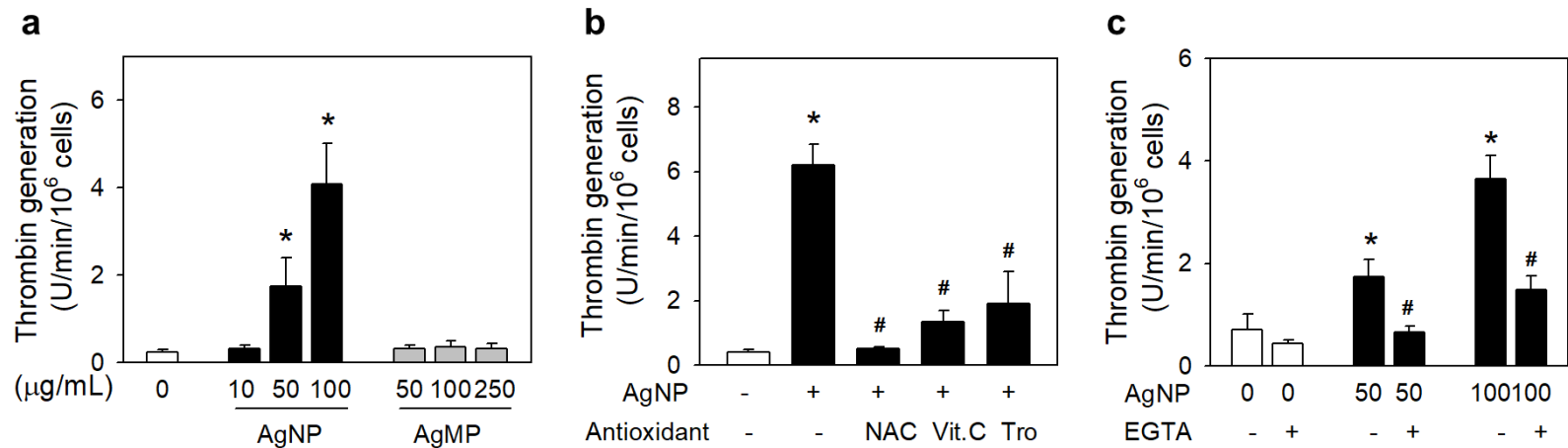
**Figure 4 | Effects of AgNP and AgMP on morphological changes of human RBCs.** After RBCs were treated with various concentration of AgNP and AgMP for 4 hrs, (a, b) RBCs were treated with 100  $\mu\text{g/mL}$  of AgNP and AgMP for 4 hrs, and examined using confocal microscope and scanning electron microscope, respectively. Scale bars : 5  $\mu\text{m}$



**Figure 5 | Effects of AgNP and AgMP on intracellular mechanism of human RBCs.** RBCs were treated with various concentrations of AgNP and AgMP for 4 hrs, (a) ROS generation and (b) intracellular GSH level (c) ATP level were detected after RBCs were treated with AgNP and AgMP for 4 hrs. (d) Intracellular calcium level increased after 4 hr exposure to various concentrations of AgNP and AgMP. (e) Scramblase activity and (f) flippase activity were determined by measuring C<sub>6</sub>-NBD PC and C<sub>6</sub>-NBD PS translocation, respectively.

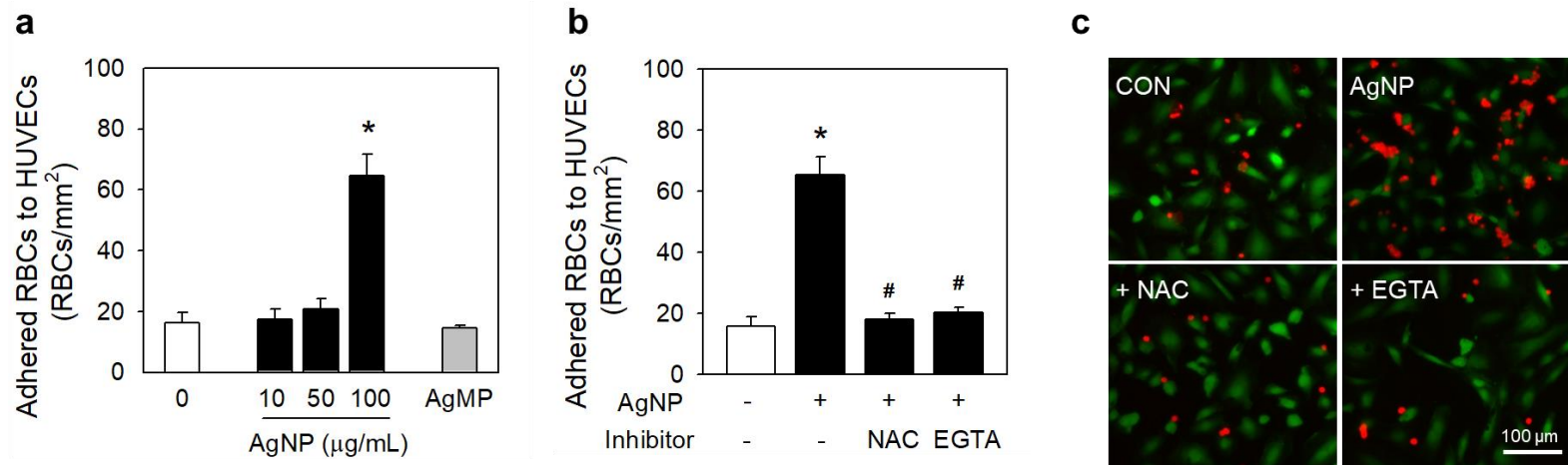


**Figure 6 | Role of ROS and  $[Ca^{2+}]_i$  on PS exposure and morphological change induced by AgNP.** (a) Before treatment with 100  $\mu\text{g/mL}$  AgNP for 4 hrs, RBCs were preincubated with various antioxidants including 100  $\mu\text{M}$  NAC for 5 min, 0.5 mM Vitamin C (Vit.C) or 1 mM Trolox (Tro) for 15 min, and then PS exposure were determined. (b) RBCs were preincubated with 3 mM EGTA for 30 min, before treatment with 0, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  of AgNP for 4 hrs, and then PS exposure were determined. (c) Inhibition of intracellular calcium was employed by 5 min pretreatment with NAC. (d, e) Before treatment AgNP, RBCs were preincubated NAC or EGTA. Shape change was observed using confocal microscope and SEM, respectively.

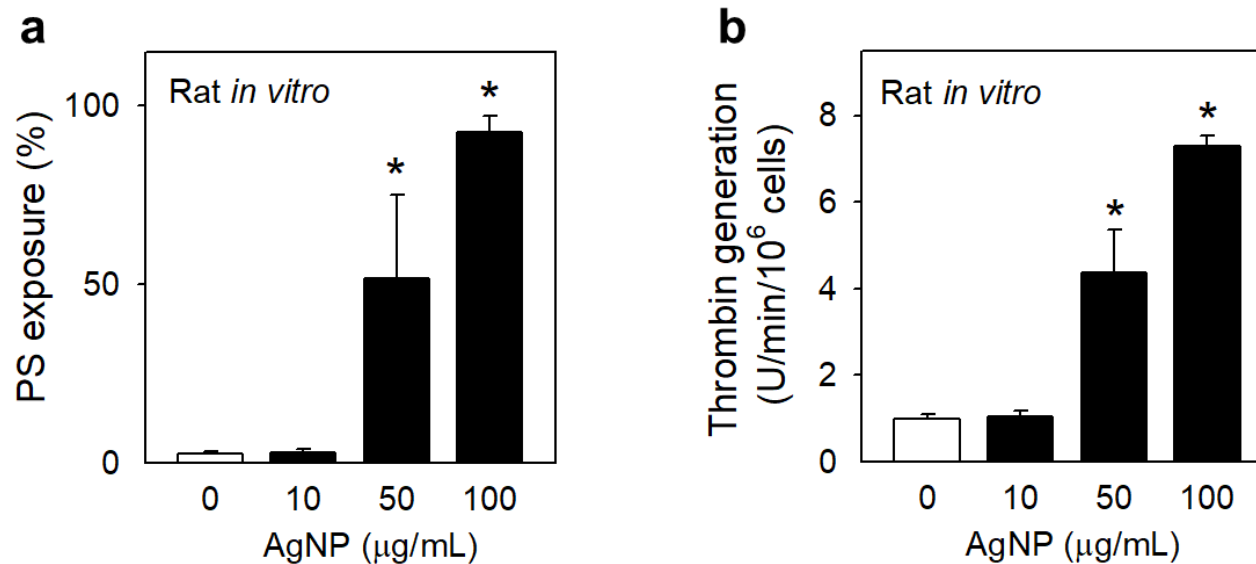


**Figure 7 | Procoagulant activity of PS exposure induced by AgNP.** Thrombin generation were determined by a prothrombinase assay after RBCs were treated (a) with various concentration of AgNP and AgMP for 4 hrs, (b) with 100 μg/mL of AgNP along with preincubation with various antioxidants and (c) with 0, 50 and 100 μg/mL of AgNP along with preincubation with EGTA. Values are mean ± S.E. of more than three independent experiments. \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ), # represents significant differences from AgNP-treated group ( $p < 0.05$ ).

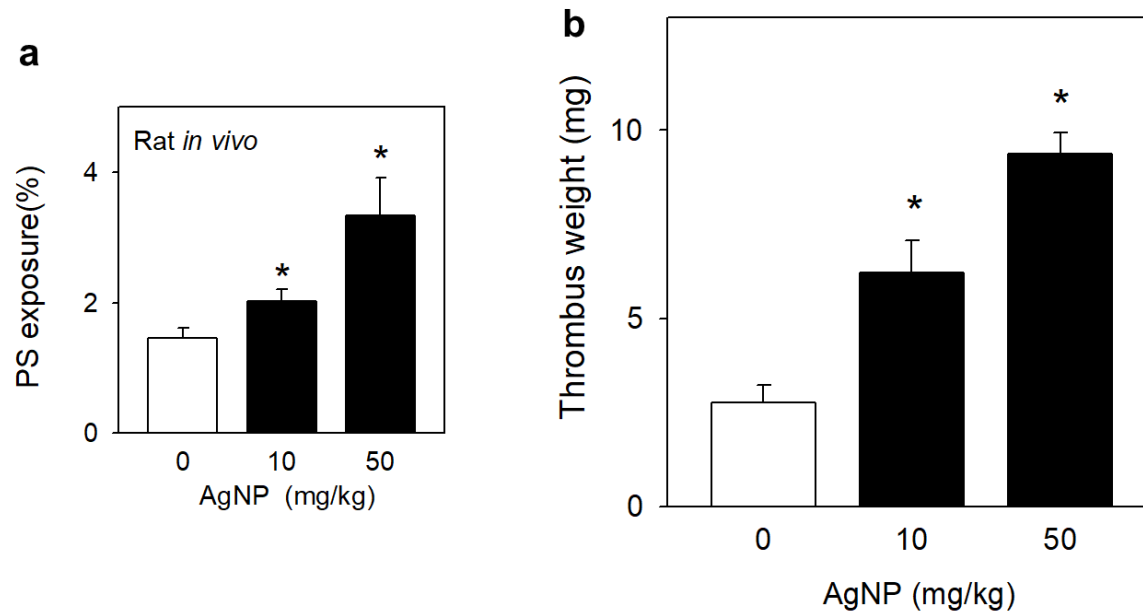




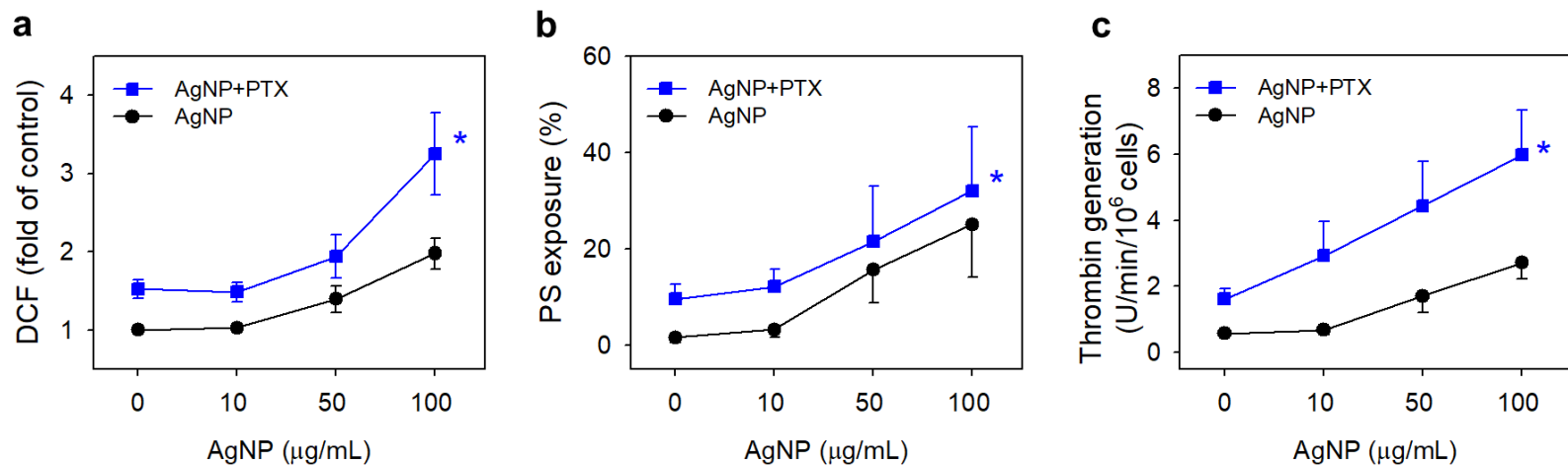
**Figure 8 | Increased adherence of AgNP-treated RBCs to human umbilical vein endothelial cells.** (a) AgNP- or AgMP-treated RBCs were incubated with HUVECs for 1 hr, and then RBCs adhered to HUVECs were counted by microscopic observation. (b) RBCs were pretreated with NAC or EGTA before AgNP treatment, and RBCs were further incubated with HUVECs for 1 hr. And then RBCs adhered to HUVECs were counted by microscopic observation or (c) examined using fluorescence microscope as described in methods. Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments. \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ), # represents significant differences from AgNP-treated group ( $p < 0.05$ ). Scale bars: 100  $\mu$ m.



**Figure 9 | PS exposure and thrombin generation by AgNP in isolated RBCs from rats.** The freshly isolated RBCs from rats were treated with various concentrations of AgNP for 4 hrs. (a) PS exposure and (b) thrombin generation were evaluated as described in methods. Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



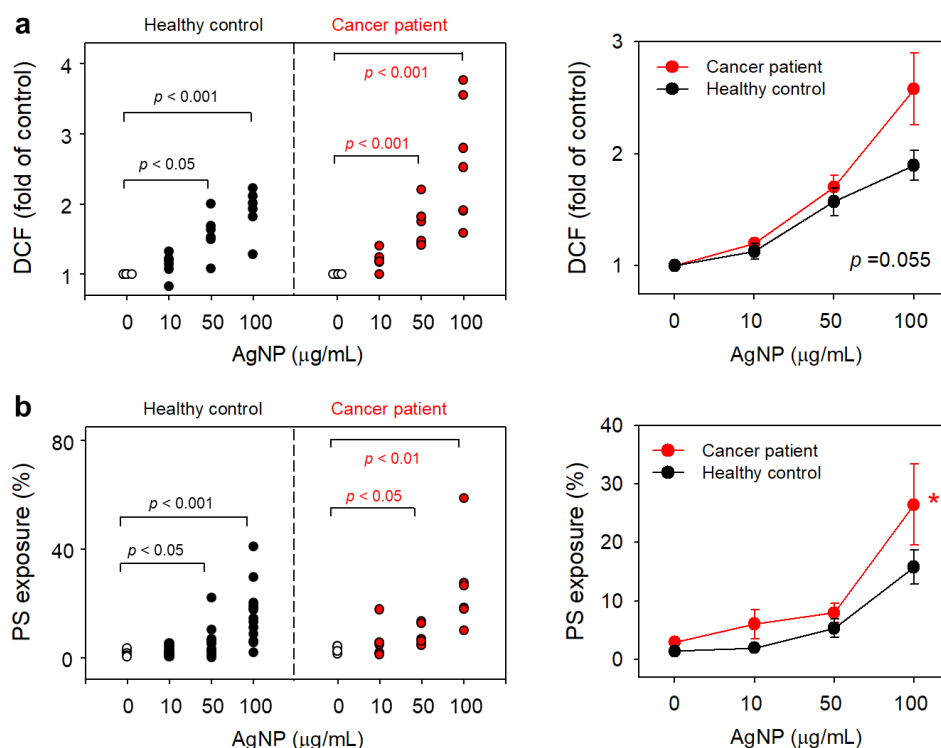
**Figure 10 | *In vivo* relevance of AgNP-induced thrombosis.** (c) Blood was collected to determine PS exposure on RBCs 2 hrs after intravenous injection of saline (control) or AgNP (10 or 50 mg/kg). (d) 2 hrs after intravenous injection of saline (control) or AgNP (10 or 50 mg/kg), thrombus formation was induced by the infusion of thromboplastin in a rat venous thrombosis model. Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



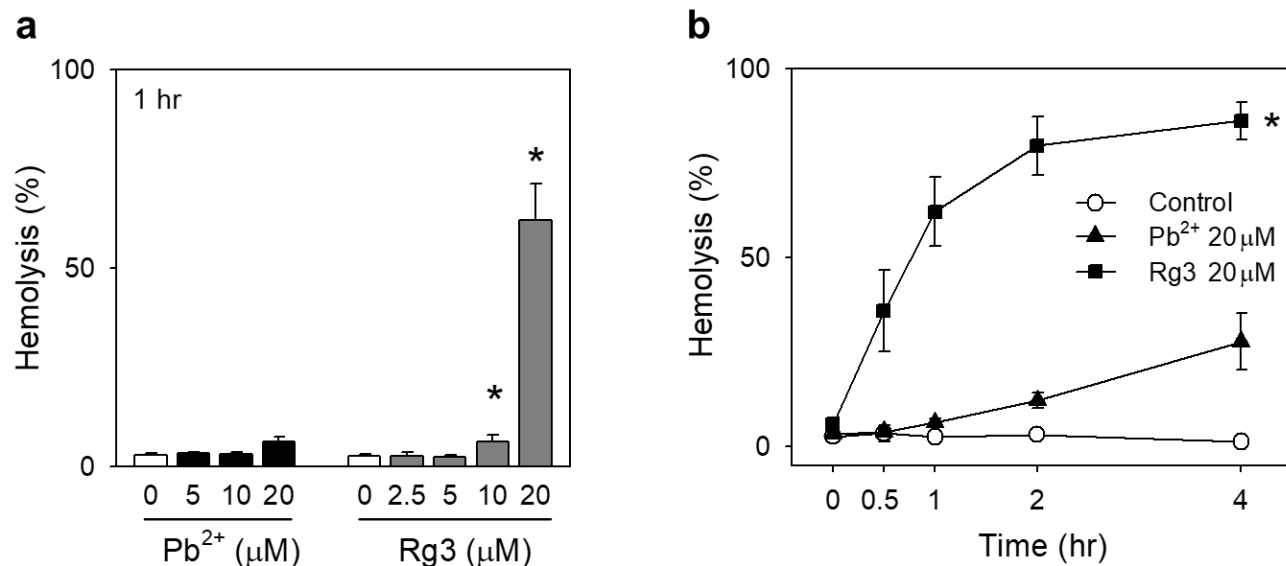
**Figure 11 | Synergy effects of AgNP with chemotherapy agent.** AgNP alone group (black circle) and paclitaxel co-treated group (blue square) were compared by measurement of (a) ROS generation and (b) PS exposure. (c) thrombin generation. Paclitaxel ( $25 \mu\text{M}$ , 15 min) was added after AgNP treatment for 4 hrs. Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).

**Table 1 | Information of cancer patients in this study.**

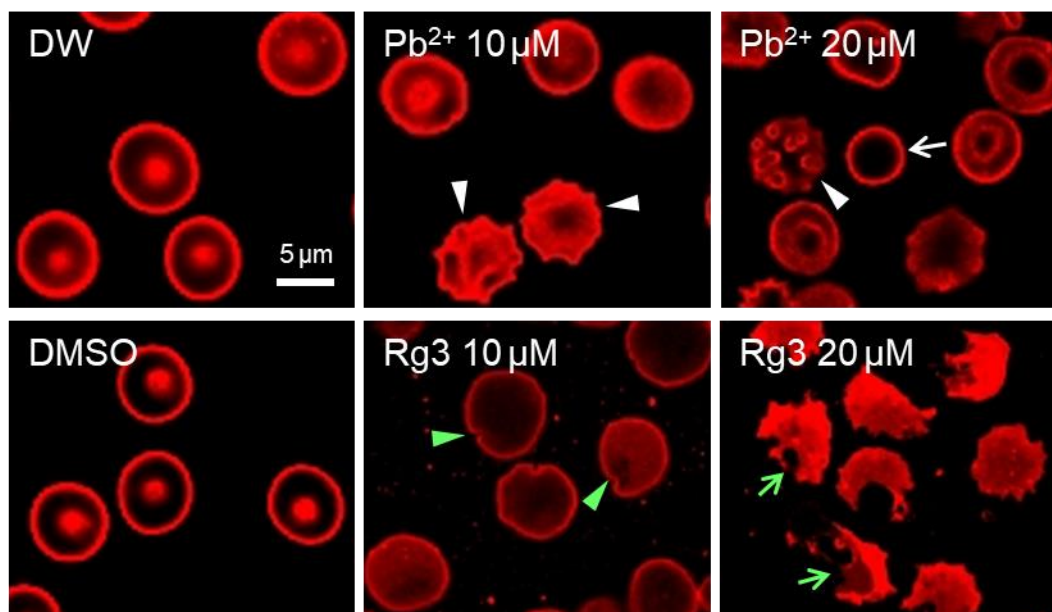
Sex	Age (yr)	Disease type	Drugs
M	30	Hodgkin Lymphoma	결핵약
M	33	Acute lymphoblastic leukemia	비타민제, 소화기관제, 호르몬제
M	41	Essential Thrombo Cythemia	항응양제
M	27	Hodgkin Lymphoma	—
M	38	Diffuse Large B-cell Lymphma	항히스타제
M	23	Hodgkin Lymphoma	호르몬제
M	28	Myelofibrosis	—
M	34	R/O Lymphoma	호르몬제
M	42	R/O Lymphoma	—
M	28	Lymphoma	—
M	44	Chronic myeloid leukemia	—
M	44	Follicular Lymphma	간장질환용제, 혈압강하제
M	37	Acute Myeloid Leukemia	—
Mean 34.5 (23- 44)			



**Figure 12 | AgNP-induced PS exposure and ROS generation in isolated RBCs from cancer patients.** Isolated RBCs from healthy control (black circle) or from cancer patients (red circle) were treated with various concentration of AgNP for 4 hrs, and then **(a)** ROS generation and **(b)** PS exposure were examined using flow cytometry. **(a, b, left)** Dot plots showed individual assessment and **(a, b, right)** line graphs showed overall comparative evaluation between healthy controls (black line) and cancer patients (red line). Values are mean  $\pm$  S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).

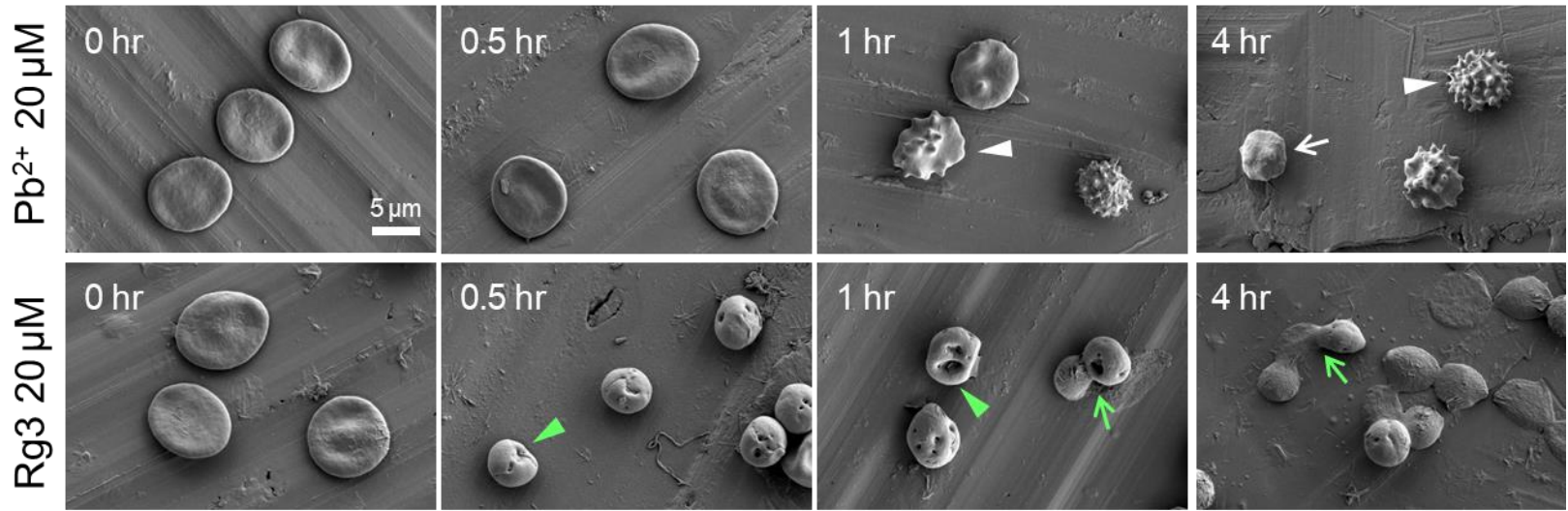


**Figure 13 | Effects of Pb<sup>2+</sup> and Rg3 on hemolytic activity in human RBCs.** (a) After RBCs were treated with 0, 5, 10, 20 μM Pb<sup>2+</sup> and 0, 2.5, 5, 10, 20 μM Rg3 for 1 hour, hemolysis was measured at 540 nm, in addition. (b) time-dependency increase was observed in RBCs treated with high concentration (20 μM) of Pb<sup>2+</sup> and Rg3. Values are mean ± S.E. of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).

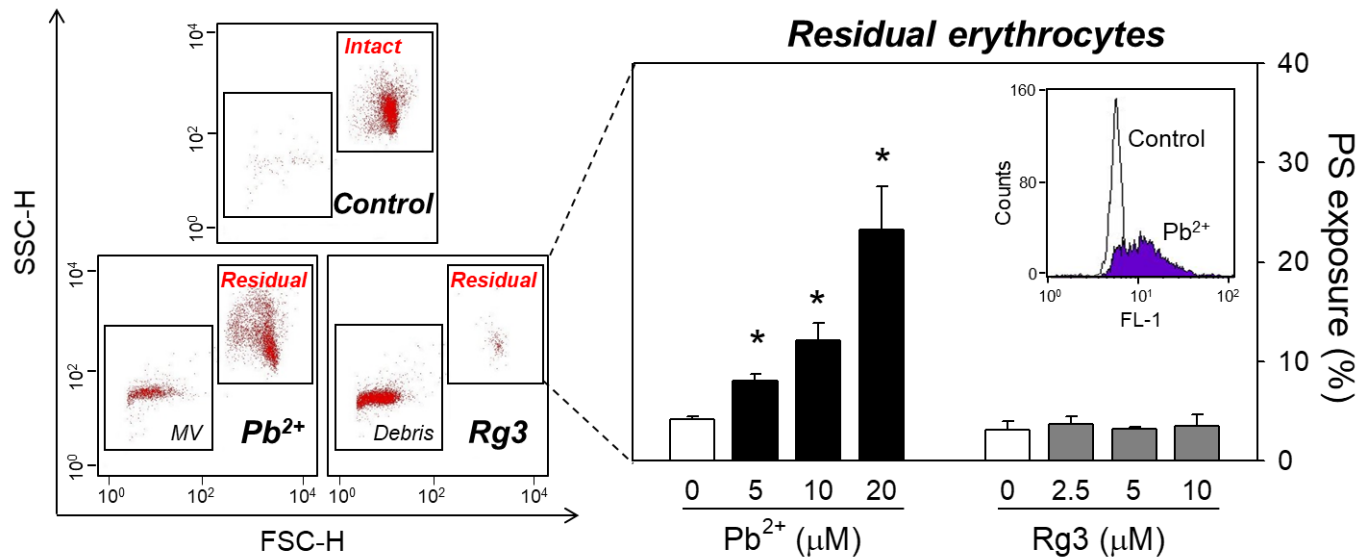


**Figure 14 | Confocal observation of morphological changes induced by  $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3 in human RBCs.** After 4 hours exposure of RBCs to 0, 10, 20  $\mu\text{M}$  of  $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3, (a) morphological changes were observed under confocal microscopy. Pore formation (green arrow heads) and burst cells to debris (green arrows) were shown in Rg3 groups. Bar : 5  $\mu\text{m}$

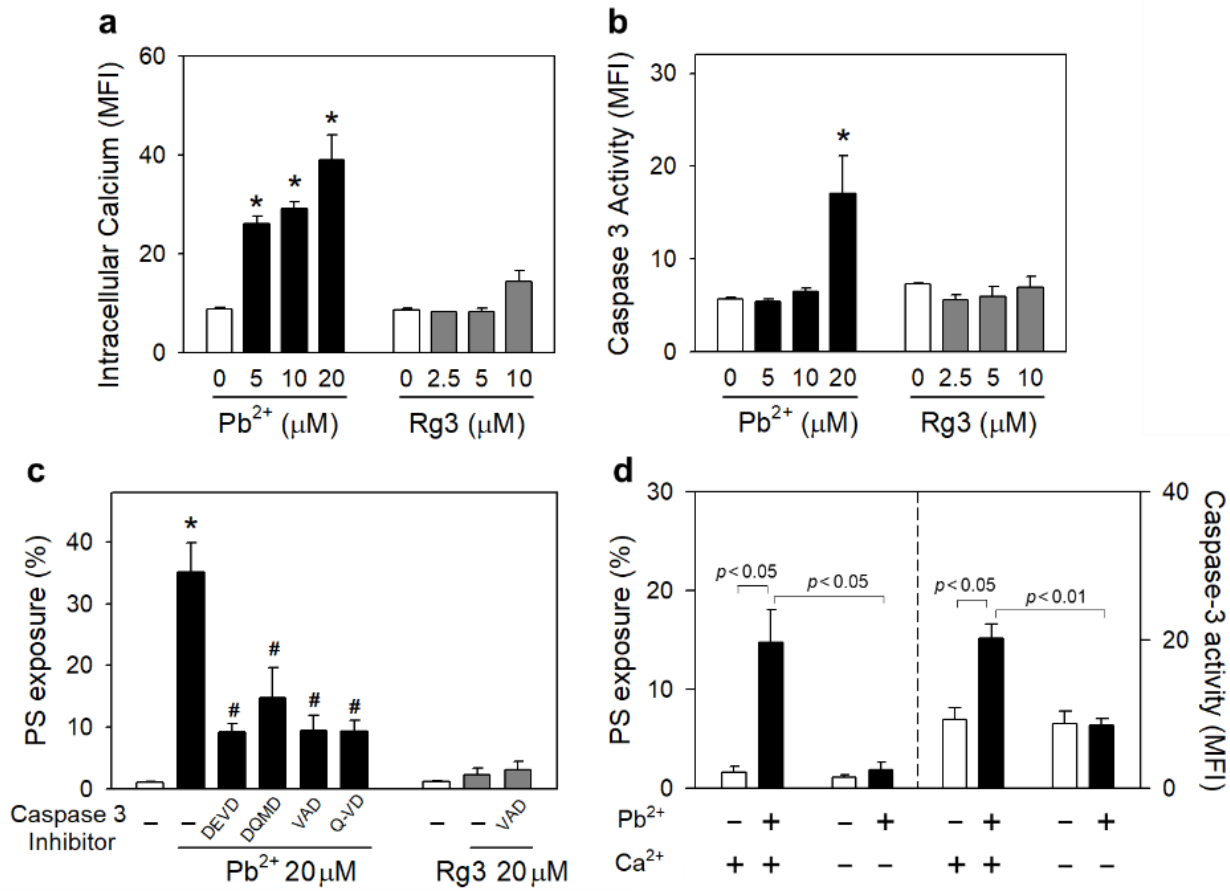




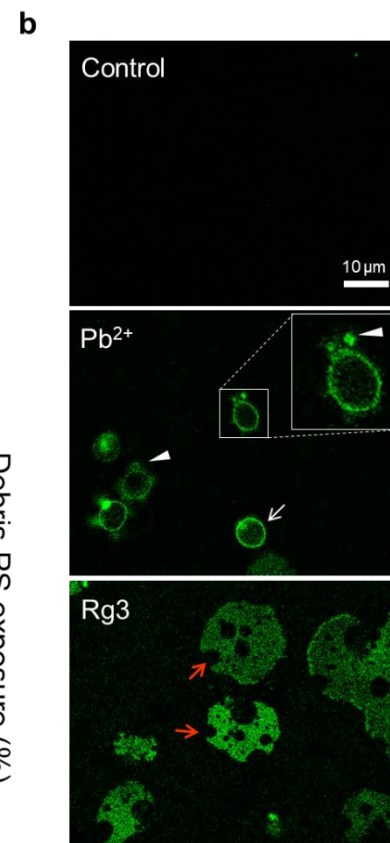
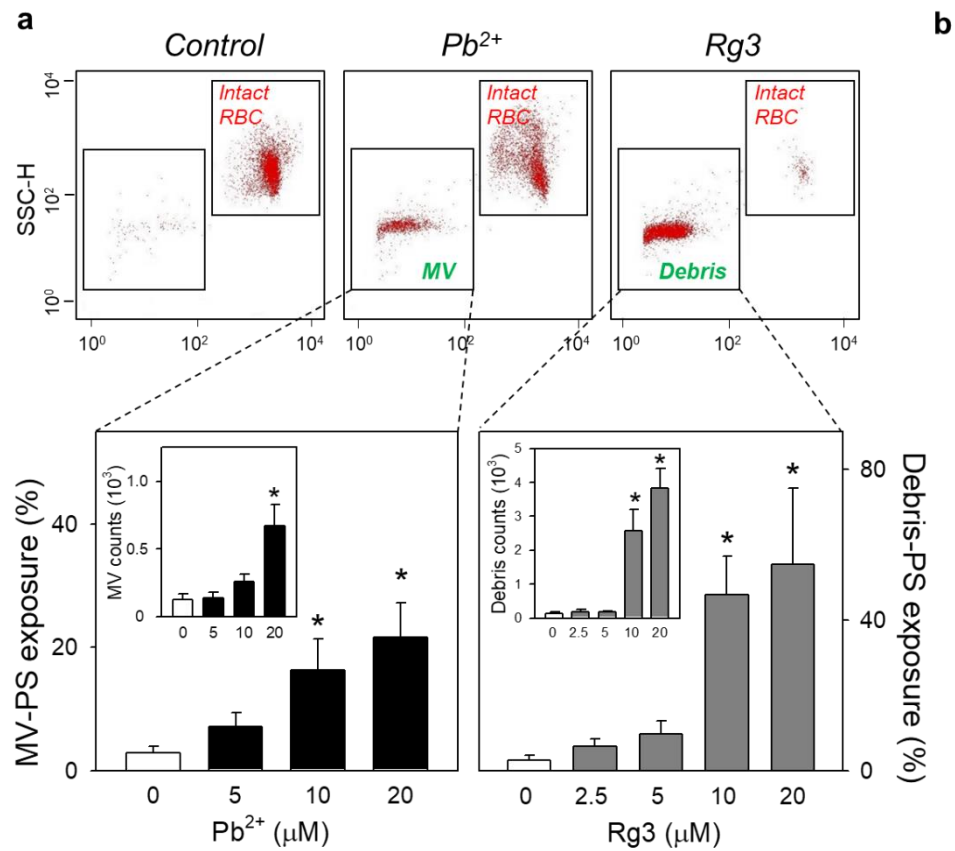
**Figure 15 | Scanning electron microscopic observation of morphological changes induced by  $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3 in human RBCs.** Changes on the cell surface and shape over time were observed, after RBCs were treated with 20  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3 over time (0, 0.5, 1 and 4 hours), and fixed to be examined using scanning electron microscope (SEM). Echinocytes (white arrow heads) and spherocytes (white arrows) were shown in  $\text{Pb}^{2+}$  groups. Pore formation (green arrow heads) and burst cells to debris (green arrows) were shown in Rg3 groups. Bar : 5  $\mu\text{m}$



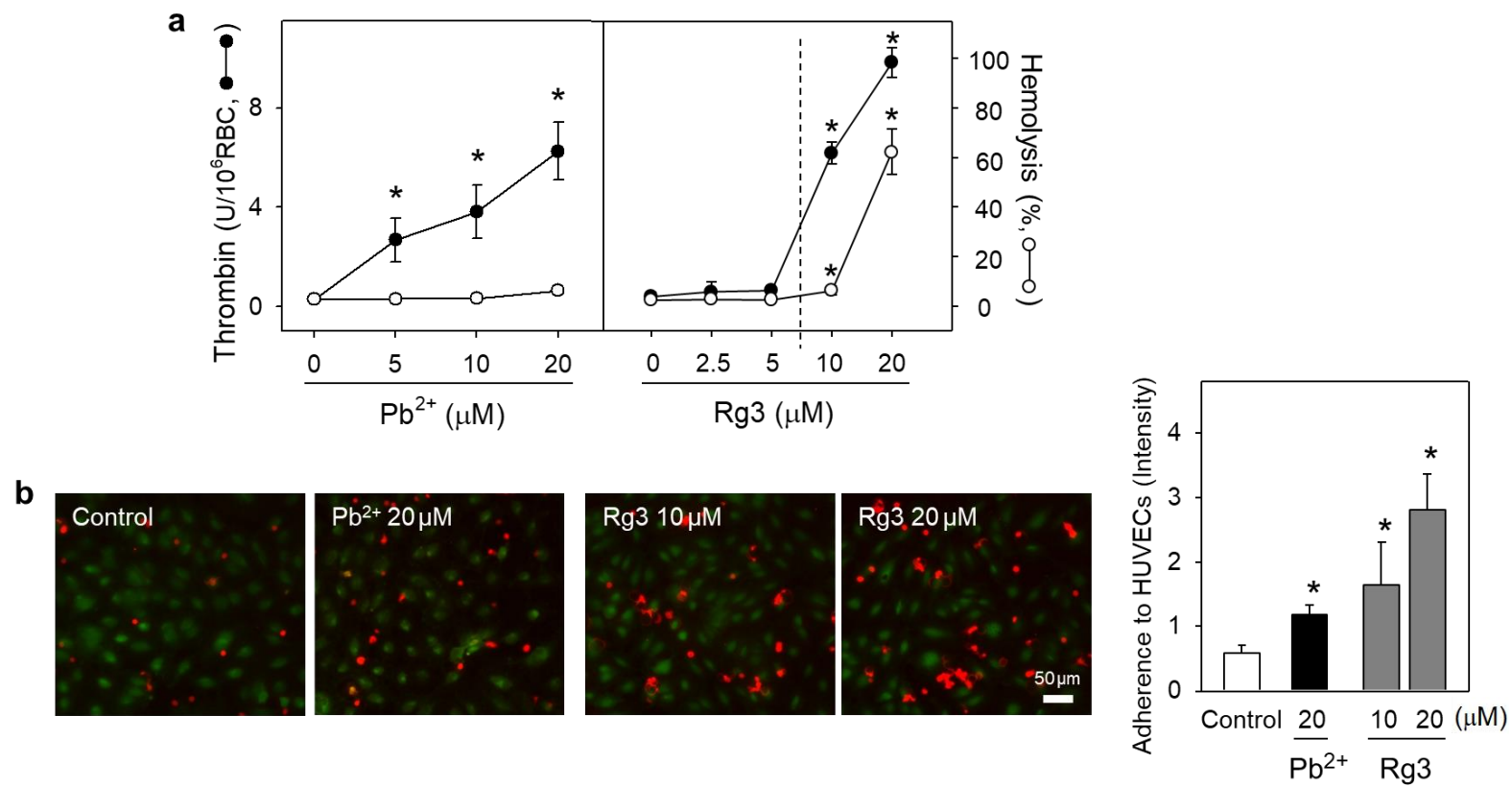
**Figure 16 | PS exposure of human residual RBCs by Pb<sup>2+</sup> and Rg3.** RBCs were treated with 0, 5, 10, 20 μM Pb<sup>2+</sup> and 0, 2.5, 5, 10 μM Rg3 for 1 hour at 37°C. **(Left)** Using flow cytometry, both intact cells and MV or debris were determined and analyzed respectively. **(Right)** In intact RBCs, PS exposure was increased by Pb<sup>2+</sup> instead of Rg3. Values are mean ± SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group (p < 0.05).



**Figure 17 | Intracellular molecular events underlying PS exposure of human residual RBCs by Pb<sup>2+</sup> and Rg3.** RBCs were treated with non-hemolytic concentrations of Pb<sup>2+</sup> and Rg3 for 1 hour at 37°C. With analysis of intact RBCs using flow cytometry, Pb<sup>2+</sup>, instead of Rg3, also exaggerated the increase of **(a)** intracellular calcium level, and **(b)** caspase 3 activity. PS exposure induced by 20 µM Pb<sup>2+</sup> and 10 µM Rg3 for 1 hour were measured **(c)** after pretreatment with caspase 3 inhibitors or **(d, left)** without calcium ions; **(d, right)** caspase 3 activity were measured without calcium ions. Values are mean ± SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group (p < 0.05).

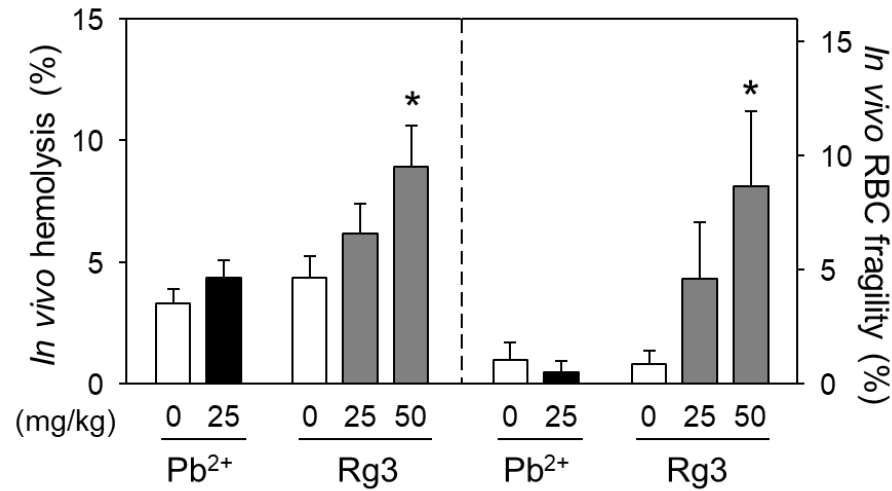


**Figure 18 | Identification of PS exposure on debris RBC induced by Rg3.** RBCs were treated with various concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3 for 1 hour at 37°C. Compared to analysis of intact cells, (a, left) MV counts and their PS exposure were increased by  $\text{Pb}^{2+}$ , and (a, right) debris counts and their PS exposure were also increased by Rg3. (b) Annexin V-FITC for 30 min were employed after cells were exposed to DW (control),  $\text{Pb}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) or Rg3 (20  $\mu\text{M}$ ) for 1 hour, and externalized PS on the cells were observed using confocal microscopy. MV derived from  $\text{Pb}^{2+}$ -treated RBCs (white arrow heads) and PS existed on intact RBCs membranes (white arrow) were observed. Annexin V<sup>+</sup> debris from Rg3-treated RBCs (red arrows) were observed irregularly in size and shape.

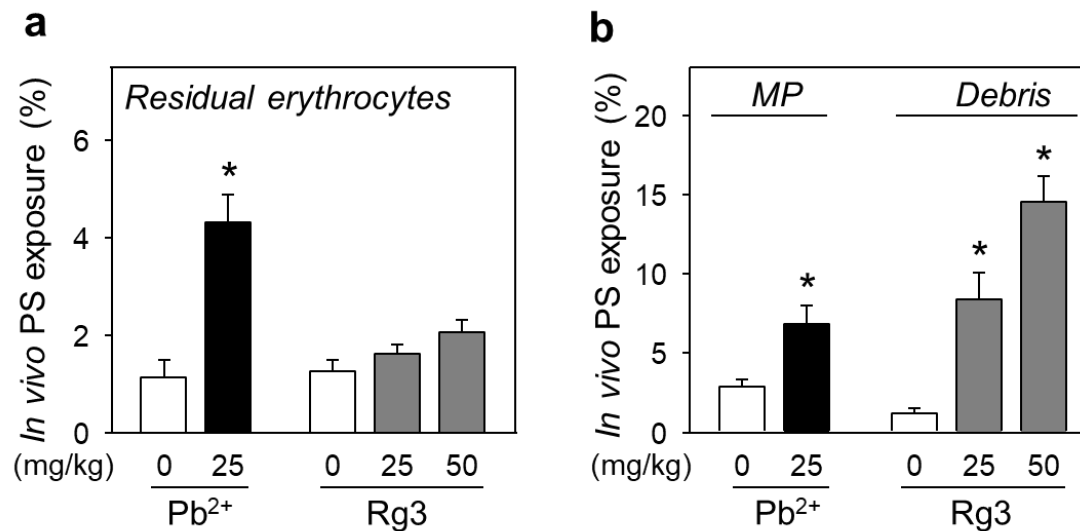


**Figure 19 | Biological effects of PS exposure by Rg3 treatment.** (a) After RBCs were treated with various concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3 for 1 hour at 37°C, enhancement of thrombin generation (black circle) was measured by pro-thrombinase assay at 405nm, and hemolytic activity (white circle) was measured at 540 nm. (b)  $\text{Pb}^{2+}$  and Rg3- treated RBCs were further incubated with pre-stained human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for 1 hour at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  incubator. After co-incubation and staining RBCs, and then adherent RBCs to HUVECs were examined using fluorescence microscope. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ). Bar : 50  $\mu\text{m}$ .

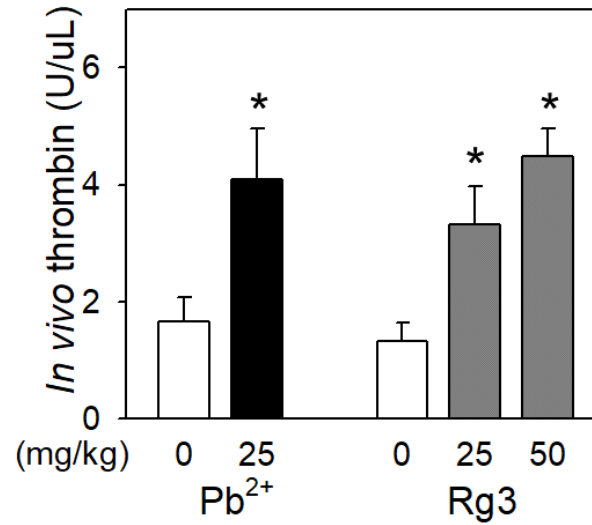




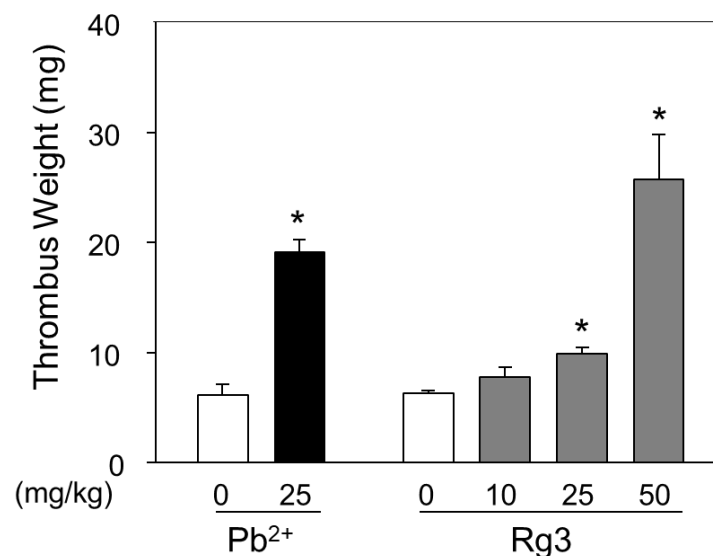
**Figure 20 | In vivo hemolysis and RBC fragility induced by Rg3.** For in vivo study, one hour after intravenous injection of saline (as control for  $Pb^{2+}$ ), 25 mg/kg  $Pb^{2+}$  or 10 minutes after intravenous injection of 5% DMSO in saline (as control for Rg3), Rg3 25 mg/kg and 50 mg/kg, blood was collected to determine in vivo hemolysis and in vivo fragility of RBCs in 0.45% NaCl. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



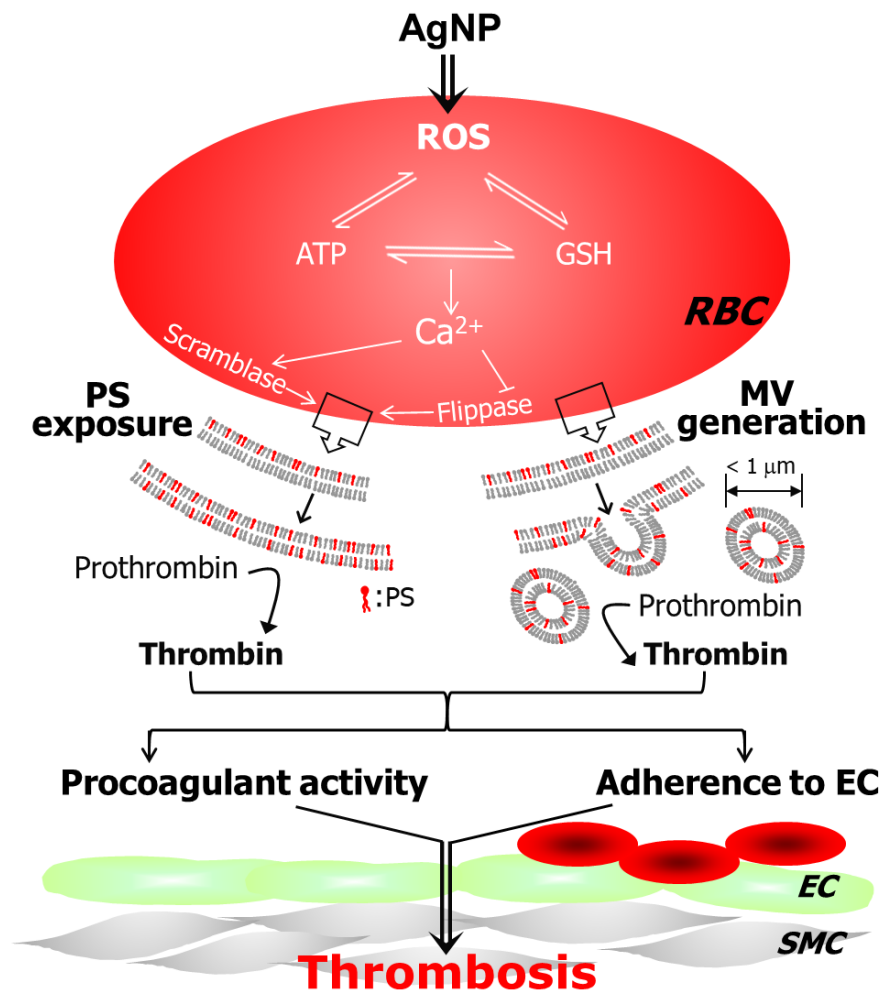
**Figure 21 | In vivo PS exposure in residual and fragmented (debris) RBCs induced by Rg3.** For in vivo study, one hour after intravenous injection of saline (as control for Pb<sup>2+</sup>), 25 mg/kg Pb<sup>2+</sup> or 10 minutes after intravenous injection of 5% DMSO in saline (as control for Rg3), Rg3 25 mg/kg and 50 mg/kg, blood was collected to determine (a) in vivo PS exposure of intact RBCs, as well as (b) PS exposure of in vivo MV or debris. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



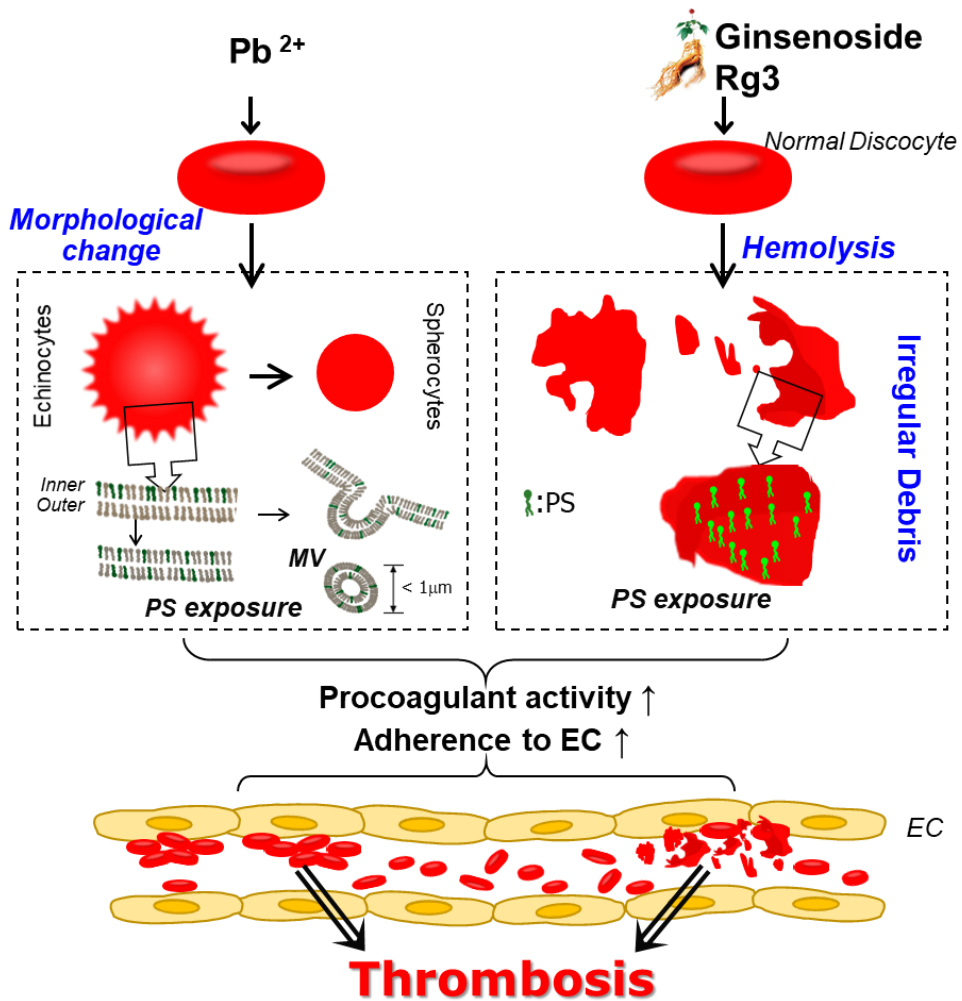
**Figure 22 | In vivo procoagulant activity of RBCs increased by Rg3.** Rats were intravenously injected with saline (as control for Pb<sup>2+</sup>), 25 mg/kg Pb<sup>2+</sup> for 1 hour or with 5% DMSO in saline (as control for Rg3), Rg3 25 mg/kg and 50 mg/kg for 10 minutes. Enhancement of thrombin generation was measured by pro-thrombinase assay at 405nm,. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



**Figure 23 | *In vivo* relevance of hemolysis-associated thrombus formation induced by Rg3.** Rats were intravenously injected with saline (as control for Pb<sup>2+</sup>), 25 mg/kg Pb<sup>2+</sup> for 1 hour or with 5% DMSO in saline (as control for Rg3), Rg3 25 mg/kg and 50 mg/kg for 10 minutes. And then, thrombus formation was initially induced using thromboplastin in a rat venous thrombosis model. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).



Scheme 1 | Suggested mechanism for the procoagulant activity of red blood cells (RBC) by silver nanoparticles (AgNP).



Scheme 2 | Suggested mechanism of hemolysis-associated thrombosis

# 고 찰

## I. AgNP의 혈전 생성 촉진

여기에서 우리는 AgNP (사이즈가 100 nm 미만)에 의한 적혈구 (RBC)에서의 PS 노출과 MV 생성을 관찰하였으며 이는 주로 ROS 생성과 세포 내 칼슘 증가를 통해 발생한다는것을 확인하였다. 비 용혈적인 농도에서 AgNP에 의해 적혈구 응고 촉진 활성화가 관찰되었으며, 더 중요한 것은 in vivo 쥐 정맥 혈전 모델에서도 PS 노출이 증가하고 혈전이 나타난다는것이 발견되었다 (Scheme 1). 또한, 주목해야 할 점은 AgNP는 적혈구의 응고 촉진 작용을 촉진하는 화학 요법 제 파클리탁셀과의 상승 작용을 나타내고 암 환자의 적혈구가 AgNP의 응고 촉진 효과에 더 민감하다. 따라서, 암 환자 및 암 질환 치료에서 사용시 AgNP를 응용하는 데주의해야 한다.

AgNP의 세포 독성을 비롯한 여러 연구에서 AgNP의 독성이 다양한 세포에서 in vitro (AshaRani, et al., 2008, Braydich-Stolle, et al., 2005, Hussain, et al., 2005)로 관찰되었으며 각 기관 내 AgNP의 생체 분포, 제거, 축적 및 AgNP 노출과 관련된 잠재적 인 기관 독성 평가등이 보고되었다 (Kim, et al., 2008, van der Zande, et al., 2012). 혈액 세포와 순환하는 동안 AgNP가 신체로 들어가는 직접적인 접촉을 고려할 때, AgNP의 잠재적 인 심혈 관계 독성에 대한 우려도 점차 커지고 있다. 그러나 병리학 적 영향과 관련하여 적혈구의 AgNP 독성이 연구는 많이 알려져 있지 않았다. 이전의 연구는 RBC의 구조적 완전성

또는 용혈, 산화 스트레스 및 막 손상과 같은 초기 사건에 대한 AgNP의 직접적인 독성에 초점을 맞추어 질병에 이르는 메커니즘으로 그들을 확장시키지 않았다. 여기에서 우리는 AgNP가 잠재적인 심혈 관계 독성에 대한 중요한 단서를 제공하는 적혈구의 응고 촉진제 활성을 통해 혈전증을 촉진 할 수 있음을 입증했다.

이전에 보고된 바 와 같이 높은 농도의 AgNP(> 300, 최대 500  $\mu\text{g/mL}$ )은 적혈구의 용혈과 관련하여 독성 효과가 조사되었었다 (Kim and Shin, 2014). 이와 같이, 우리의 실험에서도 높은 농도의 AgNP (250  $\mu\text{g/mL}$  ~ 500  $\mu\text{g/mL}$ )에서 유의한 용혈을 관찰 할 수 있었다. 이에 비해, 낮은 농도인 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 AgNP에 대한 적혈구의 노출은 용혈이 나타나지 않았다. 또한, 적혈구에 의한 AgNP uptake는 저농도 ( $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$ )에서 AgNP의 잠재적 효과를 암시했다 (Chen, et al., 2015, Guo, et al., 2014). 중요한 것은 이 농도 범위가 AgNP의 항 박테리아 농도와 수렴한다는 것인데, 항 박테리아 효과를 위한 AgNP의 적용이 응고 촉진제 및 전구 혈전증 효과의 잠재적 위험을 수반 할 수 있다는 것을 반영한다 (Shrivastava, et al., 2007, Singh, et al., 2014).

현재, 생체 내 AgNP의 독성에 관한 보고서에서는 종종 논쟁의 여지가 없고 모순적이다. 생체 내에서 AgNP 독성을 입증하기 위해 단일 또는 다중 노출 및 다양한 AgNP의 구강 노출, 흡입, 복강 내 및 정맥 내와 같은 다양한 노출 경로와 크기, 표면 전하 및 표면 코팅 물질이 많은 실험 동물 종에서 탐구되었다. AgNP의 경구 투여가 만성적으로 급성 또는 아 급성 연구에서 명백한 독성을 나타내지는 않았지만 (Hong, et al., 2014, Kim, et al., 2008, Tang, et al., 2009), AgNP에 대한 정맥 내 (i.v.) 노출은 독성이 나타났었다 (Guo, et al., 2015, Xue, et al.,



2012). 쥐에서 20 mg/kg 이상의 AgNP를 정맥 투여하면 백혈구 수, 헤모글로빈 및 적혈구 수의 유의 한 변화가 있었고 40 mg/kg에서는 간 효소 (ALT, AST, ALP, GGT 및 total bilirubin)은 높았다 (Tiwari, et al., 2011). 또 다른 연구는 AgNP가 24 시간 노출에 정맥 내로 10mg / kg의 단일 용량으로 마우스에서 심장 독성을 유도 할 수 있음을 보여주었다. 일관되게, 우리 연구에서 AgNP는 적혈구의 응고 촉진 활성화를 촉진하여 10 mg / kg AgNP으로 혈전증을 유도하여 AgNP에 대한 정맥 주사가 인체 건강에 해로울 수 있음을 입증하였다 (Recordati, et al., 2015).

은나노의 독성의 원인은 나노입자 특이적인지 아니면 은이온에 의해 매개되는지 여부는 여전히 논쟁이 되고 있다. Sphaerium corneum에서 AgNP 독성을 연구한 논문에서는 은나노의 독성은 나노입자에서 방출한 은이온의 원인이라고 밝혔다 (Völker, C., et al. 2015). 또한, Sopjani et al. (2009) 연구팀은 은 이온이 RBCs death를 유도한다고 밝혔다. 하지만, Recordati et al. (2015)는 은나노의 조직분포 및 독성연구에서 이러한 은나노의 독성을 은 나노 입자 형태에 기인 한 것으로 밝혔다. 이러한 연구내용은 본 연구에서 은이온 방출과의 무관한 결과랑 흡사하며, 본 연구결과에서 보인바와 같이, 은나노에서 아주 미량의 은이온이 방출 되고 이러한 정도의 은이온은 PS노출에 영향이 전혀 없음을 알게 되었다.

ROS와 산화 스트레스는 정상적인 생리학뿐만 아니라 병리 생리학 적 과정을 조절하는데 관여한다 (Halliwell, 1991). ROS의 과도한 생산은 유전 독성, 염증, 섬유증 및 발암과 같은 일련의 병리학 적 사건을 조율하기 위해 잘 확립되어왔다. AgNP에 의해 유도 된 ROS

생성은 백혈병 세포 (Guo, et al., 2014) 및 폐 세포 (Foldbjerg, et al., 2011)에서 세포 독성 및 유전 독성을 유발하는 것으로 보고되었다. 실제로 본 연구에서도 ROS 생성은 적혈구에 대한 AgNP의 응고 촉진제 및 전구 혈전 효과에 중심적인 역할을 했다. 흥미롭게도 탄소 (Jacobsen, et al., 2008), 이산화 티타늄 (TiO<sub>2</sub>) (Long, et al., 2006),과 같은 다른 나노 물질은 신호 전달 계통을 유발하는 산화 스트레스를 유발하여 염증 유발 성 섬유 아세포 및 세포 손상을 증가시킨다. 이러한 맥락에서, AgNP 이외에도 RBC의 응고 촉진제 활성화에 대한 다른 나노 물질의 잠재적 효과는 더 많은 관심을 필요로 한다.

최근에는 나노 기술이 다양한 의료 분야에 도입되었다. Nanomedicine은 암치료에서 많이 응용되며 특히 암 환자는 진행성 질환, 혈관 내 전이 및 종양 체적 증가와 같은 이유로 고 응고 상태에 있다. 임상 적으로 검출 가능한 혈전증이 모든 암 환자의 15 ~ 20%에서 발견되었다 (Heit, et al., 2000, Silverstein, et al., 1998). 암 자체는 혈전증을 4.1 배 증가시키는 주요 혈전 위험 인자이며 화학 요법 제제는 암 치료에서 혈전증을 6.5 배 더 높일 수 있어 AgNP 사용의 위험성을 반영하였다 (Lee and Levine, 2003). 화학 요법 제와 함께 AgNP에 노출되면 암 환자의 과 응고 상태와 동시 고려 할 때 혈전 위험이 높아질 수 있으며, 더 많은 연구가 필요하다.

## II. 화학물질 유도 적혈구의 용혈에 의한 혈전 생성 촉진

본 연구에서는 용혈이 PS 노출 된 적혈구 debris를 통해 혈전증을 유도 할 수 있음을 입증했다. Rg3으로 보인 이 현상은 이미 잘 알려진 PS 노출의 메커니즘인 세포 내 칼슘 증가 또는 caspase 활성화와는 무관으로 나타났다. 용혈에 의해 촉진되는 혈전증의 위험은 용혈과 혈전증 사이의 연관성에 대한 중요한 증거를 제공하는 PS 노출 단편의 생성 증가와 결과적으로 생체 내 및 생체 내 응고 촉진제 활성화에 의해 설명 될 수 있었다 (Scheme 2).

또한, 다양한 HA환자중 무려 약 12 %이상의 혈전증 발생 및 혈전증과의 동시 발생이 보고되었으며 이것은 용혈로 인한 혈전증이 예상보다 많다는 것을 설명한다 (Barcellini, et al., 2014). 그럼에도 불구하고, 용혈이 혈전증을 유발하는 방식에 대한 메커니즘은 아직 명확하지 않다. 이전 연구에서 HA 환자에서 PS 노출과 MV 생성의 증가가 평가되었었다 (van Beers, et al., 2009). 또한, 약물을 포함한 각종 xenobiotics는 HA을 유도 할 수도 있다는 보고가 많다. 중요한 것은 이러한 약물 중 일부는 혈전증과 관련되어 있다는 것이다 (Al-Nouri, et al., 2015). 예를 들면 아스코르브 산, 퀴닌 및 퀴니 딘과 같은 약물의 혈전 보고가 있었다. 이러한 약물의 혈전 위험은 PS 노출 및 MV생성이 나타난다고 한다 (Kim, et al., 2015, McCrae, 2006, Mischitelli, et al., 2016). 그러나 HA 환자 나 약물에 의한 용혈과 혈전증 사이의 연관성은 아직 완전히 연구되지 않았다. 본 연구에서는 적혈구에 대한 PS 노출이나 PS 노출을 유발하는 고전적 메커니즘과 상관없이 용혈 자체가 혈전증의 잠재적 위험을 높일 수 있음을 입증했다.

MV (1  $\mu\text{m}$  이하)는 혈전증의 주요 매개체로 간주되어 왔다 (Aharon and Brenner, 2009). MV의 생성은 또한 용혈과 관련된 병리학 적 컨디션으로도 간주되어왔다 (Olatunya, et al., 2017, van Beers, et al., 2009). 일반적으로 MV는 flow cytometry에서 산란에 의해 1  $\mu\text{m}$  보다 작은 입자로 검출된다 (Shet, 2008). 따라서 MV를 용혈로 인한 debris와 구별하는 것은 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 형광 표지된 annexin V를 사용하여 현미경으로 관찰한 결과, 용혈과 관련된 debris를 intact cell에서 생성된 PS-bearing MV와 성공적으로 구별할 수 있었다.

본 연구에서는 in vitro 및 in vivo 실험시스템에서 HA 질환과 약물 유도성 HA를 모의 실험으로 용혈 관련 혈전증을 연구하기 위해 용혈 활성을 가진 Rg3(Huang, 1998)를 사용했다. Rg3은 적혈구를 직접 파괴시켜 불규칙한 조각 irregular debris를 남긴다. 이러한 irregular debris는 in vitro 및 in vivo에서의 flow cytometry 분석에서 입증된 바와 같이 PS 노출이 보였고, 응고 촉진제 활성 및 혈전증을 촉진시켜 적혈구의 직접적인 용혈중 생성된 debris가 혈전증을 증가시킬 수 있음을 보여준다. 본 연구에서는 적혈구 매개 혈전증에 대한 이런 새로운 작용 방식이 다양한 용혈성 질환에서 증가된 혈전 발생을 설명할 수 있다고 믿는다. 또한, 용혈 및 혈전 보고가 많은 quinine으로 실험한 결과에서도 Rg3와 비슷한 적혈구 모양 변화 및 debris에서의 PS 노출이 관찰되었다. 이러한 결과는 Rg3 또는 quinine 처럼 용혈성 활성이 있는 다른 약물에서도 이와 같은 방식으로 용혈을 매개로 혈전증이 나타날 수 있다고 제시한다.

## 결 론

첫째, 본 연구에서는 AgNP 적혈구의 응고 촉진제 활성을 증가시킴으로써 혈전 형성 위험을 증가시킬 수 있음을 in vitro 와 in vivo 에서 모두 입증하였다. 이러한 영향은 주로 산화 스트레스와 ROS 생성과 관여있음을 보였다. 특히 암환자의 적혈구에서 AgNP 의 혈액 응고 촉진 활성화가 더 유의하게 증가하였고, 또한 화학 요법 제제인 파클리탁셀과의 시너지 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 실제 암환자에게 암치료시 AgNP 의 사용에 주의를 기울여야 한다는것을 경고한다.

둘째, 결론적으로 본 연구에서는 용혈의 과정 (pore formation and cell lysis)을 거쳐 남긴 PS-bearing irregular debris 는 혈전증에 기여할수 있음을 입증하였다. 이러한 현상은 세포 내 칼슘 증가 또는 카스파 제 3 활성화 같은 intact cell 에서 PS 가 세포막 안쪽에서 외부로 노출시키는 기존 메커니즘과는 다르지만 응고 촉진제 활성 및 혈전증의 유사한 결과를 가져왔다. 따라서 본 연구는 적혈구 매개 혈전증에 관여하는 새로운 메커니즘을 연구된 바 다양한 용혈성 질환 및 약물에 의한 용혈 경우에서 증가 된 혈전증을 이해하는데 도움이 된다고 믿는다.

## 참 고 문 헌

- Aharon, A. and B. Brenner (2009). "Microparticles, thrombosis and cancer." *Best Practice & Research Clinical Haematology* 22(1): 61-69.
- Al-Nouri, Z. L., et al. (2015). "Drug-induced thrombotic microangiopathy: a systematic review of published reports." *Blood* 125(4): 616-618.
- Andrews, D. A. and P. S. Low (1999). "Role of red blood cells in thrombosis." *Current opinion in hematology* 6(2): 76.
- Arora, S., et al. (2008). "Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies." *Toxicology letters* 179(2): 93-100.
- AshaRani, P., et al. (2008). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells." *ACS nano* 3(2): 279-290.
- Asharani, P., et al. (2010). "Investigations on the structural damage in human erythrocytes exposed to silver, gold, and platinum nanoparticles." *Advanced Functional Materials* 20(8): 1233-1242.
- Ataga, K. I. (2009). Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias, *Haematologica*. 94: 1481-1484.
- Banerjee, T. and F. A. Kuypers (2004). "Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells." *British journal of haematology* 124(3): 391-402.
- Barcellini, W., et al. (2014). "Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients." *Blood*

124(19): 2930-2936.

Bennett, C. L., et al. (1998). "Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine: a review of 60 cases." *Annals of internal medicine* 128(7): 541-544.

Bhuyan, A. A. M., et al. (2017). "Triggering of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death by Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) inhibitor Temsirolimus." *Cellular physiology and biochemistry* 42(4): 1575-1591.

Birchmeier, W. and S. Singer (1977). "On the mechanism of ATP-induced shape changes in the human erythrocyte membranes: the role of ATP." *The Journal of cell biology* 73(3): 647-659.

Braydich-Stolle, L., et al. (2005). "In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells." *Toxicological sciences* 88(2): 412-419.

Brookes, P. S., et al. (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287(4): C817-C833.

Chaloupka, K., et al. (2010). "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications." *Trends in biotechnology* 28(11): 580-588.

Chen, L. Q., et al. (2015). "Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity." *Chemical research in toxicology* 28(3): 501-509.

Circu, M. L. and T. Y. Aw (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis." *Free Radical Biology and Medicine* 48(6): 749-762.

Comfurius, P., et al. (1990). "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma

membrane and inhibition of aminophospholipid translocase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1026(2): 153-160.

Daleke, D. L. (2003). "Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry." *Journal of lipid research* 44(2): 233-242.

Deuticke, B. (1968). "Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 163(4): 494-500.

Egler, J. and F. Lang (2017). "Triggering of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death, by Perifosine." *Cellular physiology and biochemistry* 41(6): 2534-2544.

Ehmann, W. C. (1992). "Cephalosporin-induced hemolysis: A case report and review of the literature." *American journal of hematology* 40(2): 121-125.

El Badawy, A. M., et al. (2010). "Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles." *Environmental science & technology* 45(1): 283-287.

Foldbjerg, R., et al. (2011). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549." *Archives of toxicology* 85(7): 743-750.

Foldbjerg, R., et al. (2009). "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes." *Toxicology letters* 190(2): 156-162.

Francischetti, I., et al. (2008). "Blood coagulation, inflammation, and malaria." *Microcirculation* 15(2): 81-107.

Franck, P., et al. (1985). "Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells." *The Journal of clinical investigation* 75(1):



183-190.

Freedman, A., et al. (1956). "Hemolytic anemia due to quinidine: observations on its mechanism." *The American journal of medicine* 20(5): 806-816.

Gao, C., et al. (2012). "Procoagulant activity of erythrocytes and platelets through phosphatidylserine exposure and microparticles release in patients with nephrotic syndrome." *Thrombosis and haemostasis* 107(4): 681-689.

Goudnough, L., et al. (1984). "Increased incidence of thromboembolism in stage IV breast cancer patients treated with a five-drug chemotherapy regime. A study of 159 patients." *Cancer* 54(7): 1264-1268.

Guo, D., et al. (2014). "The cellular uptake and cytotoxic effect of silver nanoparticles on chronic myeloid leukemia cells." *Journal of biomedical nanotechnology* 10(4): 669-678.

Guo, H., et al. (2015). "Intravenous administration of silver nanoparticles causes organ toxicity through intracellular ROS-related loss of inter-endothelial junction." *Particle and fibre toxicology* 13(1): 21.

Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." *The American journal of medicine* 91(3): S14-S22.

Heit, J. A., et al. (2000). "Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study." *Archives of internal medicine* 160(6): 809-815.

Homan, K., et al. (2010). "Silver nanosystems for photoacoustic imaging and image-guided therapy." *Journal of biomedical optics* 15(2): 021316-021316-

021319.

Hong, J.-S., et al. (2014). "Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test." *Nanotoxicology* 8(4): 349-362.

Huang, K. C. (1998). *The pharmacology of Chinese herbs*, Second Edition, Routledge.

Hussain, S., et al. (2005). "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells." *Toxicology in vitro* 19(7): 975-983.

Ibrahim, I., et al. (2006). "Oxidative hemolysis of erythrocytes induced by various vitamins." *International journal of biomedical science: IJBS* 2(3): 295.

Iglić, A., et al. (1998). "Amphiphile induced echinocyte-spherioechinocyte transformation of red blood cell shape." *European Biophysics Journal* 27(4): 335-339.

Jacobsen, N. R., et al. (2008). "Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60 fullerenes in the FE1-Muta™ Mouse lung epithelial cells." *Environmental and molecular mutagenesis* 49(6): 476-487.

Jun, E.-A., et al. (2011). "Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity." *Nanotoxicology* 5(2): 157-167.

Kim, J. S., et al. (2011). "In vivo genotoxicity of silver nanoparticles after 90-day silver nanoparticle inhalation exposure." *Safety and health at work* 2(1): 34-38.

Kim, K., et al. (2015). "High-dose vitamin C injection to cancer patients may

promote thrombosis through procoagulant activation of erythrocytes." *Toxicological sciences* 147(2): 350-359.

Kim, M. J. and S. Shin (2014). "Toxic effects of silver nanoparticles and nanowires on erythrocyte rheology." *Food and Chemical Toxicology* 67: 80-86.

Kim, Y. S., et al. (2008). "Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats." *Inhalation toxicology* 20(6): 575-583.

Kwon, H.-M., et al. (2007). "Stroke as the first manifestation of concealed cancer." *Journal of the neurological sciences* 258(1): 80-83.

Larguinho, M. and P. V. Baptista (2012). "Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics—from genomics to proteomics." *Journal of proteomics* 75(10): 2811-2823.

Lee, A. Y. and M. N. Levine (1999). *The thrombophilic state induced by therapeutic agents in the cancer patient. Seminars in thrombosis and hemostasis*, Copyright© 1999 by Thieme Medical Publishers, Inc.

Lee, A. Y. and M. N. Levine (2003). "Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes." *Circulation* 107(23 suppl 1): I-17-I-21.

Levine, M. (1997). "Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy." *Thrombosis and haemostasis* 78(1): 133-136.

Lim, K.-M., et al. (2010). "Low-level mercury can enhance procoagulant activity of erythrocytes: a new contributing factor for mercury-related thrombotic disease." *Environmental health perspectives* 118(7): 928.

Livshits, Z. and L. Nelson (2010). "Vitamin-Induced Hemolysis." *EMERGENCY*

## MEDICINE.

Long, T. C., et al. (2006). "Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity." *Environmental science & technology* 40(14): 4346-4352.

Mallat, Z., et al. (2000). "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes." *Circulation* 101(8): 841-843.

Mandal, D., et al. (2005). "Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes." *Journal of Biological Chemistry* 280(47): 39460-39467.

Matarrese, P., et al. (2005). "Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases." *The FASEB Journal* 19(3): 416-418.

McCrae, K. R. (2006). PART II: THROMBOCYTOPENIA DUE TO EXCESSIVE PLATELET DESTRUCTION Platelet Clearance. *Thrombocytopenia*, CRC Press: 114-127.

Mintzer, D. M., et al. (2009). "Drug-induced hematologic syndromes." *Advances in hematology* 2009.

Mischitelli, M., et al. (2016). "Stimulation of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by Quinine." *Cellular physiology and biochemistry* 40(3-4): 657-667.

Mock, J., et al. (2002). "Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles." *The Journal of Chemical Physics* 116(15): 6755-6759.

Mohandas, N. and J. Chasis (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Seminars in hematology*.

Naik, R. P., et al. (2014). "Venous thromboembolism incidence in the cooperative study of sickle cell disease." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(12): 2010-2016.

Nieuwland, R., et al. (2000). "Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis." *Blood* 95(3): 930-935.

O'Connor, J. E., et al. (1988). "A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange." *Cytometry Part A* 9(6): 529-532.

Olatunya, O., et al. (2017). Red Blood Cells Microparticles Are Associated with Hemolysis Markers and Leg Ulceration in Patients with Sickle Cell Disease, *Blood*. 130: 3510.

Ong, C., et al. (2013). "Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity." *Current medicinal chemistry* 20(6): 772-781.

Ordzhonikidze, C., et al. (2009). "Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo." *Acta Naturae (англоязычная версия)* 1(3 (3)).

Park, M. V., et al. (2011). "The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles." *Biomaterials* 32(36): 9810-9817.

Peter, T., et al. (2015). "Programmed erythrocyte death following in vitro Treosulfan treatment." *Cellular physiology and biochemistry* 35(4): 1372-1380.

Petz, L. D., et al. (1966). "Coombs-positive hemolytic anemia caused by penicillin

- administration." *New England Journal of Medicine* 274(4): 171-178.
- Prandoni, P. and M. Monreal (2008). "Predicting recurrences or major bleeding in cancer patients with venous thromboembolism." *Thromb Haemost* 100: 435-439.
- Rak, J., et al. (2006). "Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans." *Cancer research* 66(22): 10643-10646.
- Rao, K. V. (2014 9e). *Drug-induced hematologic disorders, Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, Ninth Edition*: 931-944.
- Recordati, C., et al. (2015). "Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects." *Particle and fibre toxicology* 13(1): 12.
- Rees, D., et al. (1993). "Acute haemolysis induced by high dose ascorbic acid in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *BMJ: British Medical Journal* 306(6881): 841.
- Rodrigues, K. F., et al. (2018). "Circulating microparticles levels are increased in patients with diabetic kidney disease: A case-control research." *Clinica chimica acta*.
- Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2011). "Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology." *Trends in biochemical sciences* 36(1): 30-38.
- Seigneuret, M. and P. F. Devaux (1984). "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(12): 3751-3755.
- Shahidi, N. and D. Westring (1970). "Acetylsalicylic acid-induced hemolysis and its mechanism." *The Journal of clinical investigation* 49(7): 1334-1340.

Shander, A., et al. (2011). "Drug-induced anemia and other red cell disorders: a guide in the age of polypharmacy." *Current clinical pharmacology* 6(4): 295-303.

Shantsila, E., et al. (2010). "Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(11): 2358-2368.

Sharma, A. K. and B. Rohrer (2004). "Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line." *Journal of Biological Chemistry* 279(34): 35564-35572.

Sharma, V. K., et al. (2014). "Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity." *Advances in colloid and interface science* 204: 15-34.

Shet, A. S. (2008). "Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges." *Vascular health and risk management* 4(4): 769.

Shrivastava, S., et al. (2007). "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles." *Nanotechnology* 18(22): 225103.

Silverstein, M. D., et al. (1998). "Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study." *Archives of internal medicine* 158(6): 585-593.

Singh, K., et al. (2014). "Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles from *Tinospora cordifolia* against multi drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients." *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 5(2): 1.

Sonikpreet, S., et al. (2014). "Case Report: Autoimmune Hemolytic Anemia with

Venous Thromboembolism, a Common Complication of a Rare Disease." *Blood* 124(21): 4869-4869.

Sørensen, H. T., et al. (1998). "The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism." *New England Journal of Medicine* 338(17): 1169-1173.

Soumya, R. S. and P. G. Hela (2013). "Nano silver based targeted drug delivery for treatment of cancer." *Der Pharmacia Lettre* 5(4): 189-197.

Stockman III, J. A., et al. (1978). "Aspirin-induced hemolysis: The role of concomitant oxidant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) challenge." *Pediatric research* 12(9): 927.

Tang, J., et al. (2009). "Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats." *Journal of nanoscience and nanotechnology* 9(8): 4924-4932.

Tatsuzo, F., et al. (1979). "Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells." *Biochemical pharmacology* 28(5): 613-620.

Tiwari, D. K., et al. (2011). "Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats." *Toxicology mechanisms and methods* 21(1): 13-24.

van Beers, E. J., et al. (2009). "Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease." *haematologica* 94(11): 1513-1519.

van der Zande, M., et al. (2012). "Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure." *ACS nano* 6(8): 7427-7442.

Vance, M. E., et al. (2015). "Nanotechnology in the real world: Redeveloping the



nanomaterial consumer products inventory." Beilstein journal of nanotechnology 6: 1769.

Vandebriel, R. J., et al. (2014). "Immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28-day repeated-dose toxicity study in rats." Particle and fibre toxicology 11(1): 21.

Wadhwa, S. (2000). "Deep vein thrombosis and haemolytic anaemia in a case of overlap syndrome." Journal of Indian Academy of Clinical Medicine 5(1): 63.

Xue, Y., et al. (2012). "Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice." Journal of Applied Toxicology 32(11): 890-899.

Zeigler, Z., et al. (1979). "Immune hemolytic anemia and thrombocytopenia secondary to quinidine." Blood 53(3).

Zwaal, R., et al. (1977). "Membrane asymmetry and blood coagulation." Nature 268(5618): 358-360.

Zwaal, R. F. and A. J. Schroit (1997). "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells." Blood 89(4): 1121-1132.

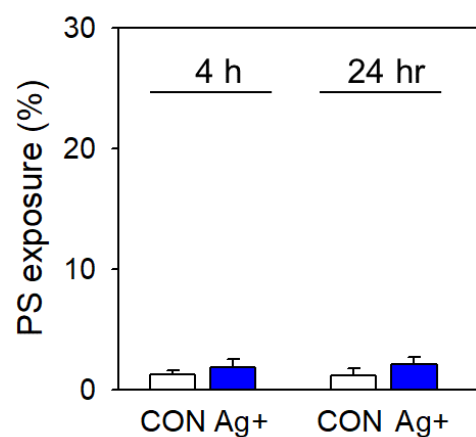
# Abstract

Silver nanoparticles (AgNP) are widely used in medical practices owing to their distinct antibacterial, antiviral and anticancer activities. However, with increasing use of AgNP, concerns over its potential toxicity are also escalating. Here, we demonstrated the potential thrombotic effect of AgNP which was mediated by the procoagulant activity of red blood cells (RBCs). In freshly isolated human RBCs, AgNP, but not silver microparticles (AgMP), elicited morphological changes, phosphatidylserine (PS) exposure and microvesicles (MV) generation, the key indicators of procoagulant activity in RBCs at relatively low concentration ranges ( $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ ) that were free of significant hemolysis. In line with this, AgNP potentiated thrombin generation and adherence of RBCs to endothelial cells, while AgMP did not. Oxidative stress, intracellular calcium increase, and ATP depletion were found to underlie the procoagulant activity of AgNP, which led to altered activity of membrane aminophospholipid translocases. These *in vitro* findings were well reproduced in rat *in vivo*, where intravenously exposure to AgNP promoted venous thrombosis significantly. Of note, RBCs isolated from cancer patients, who inherently convey the risk of thrombosis, were more sensitive to the procoagulant effects of AgNP. In addition, AgNP significantly potentiated the procoagulant effects of a chemotherapeutic drug, paclitaxel. Collectively, these results suggest that AgNP may have prothrombotic risks by promoting procoagulant activity of RBCs and caution shall be taken for its use in the population sensitive to thrombosis like cancer patients.

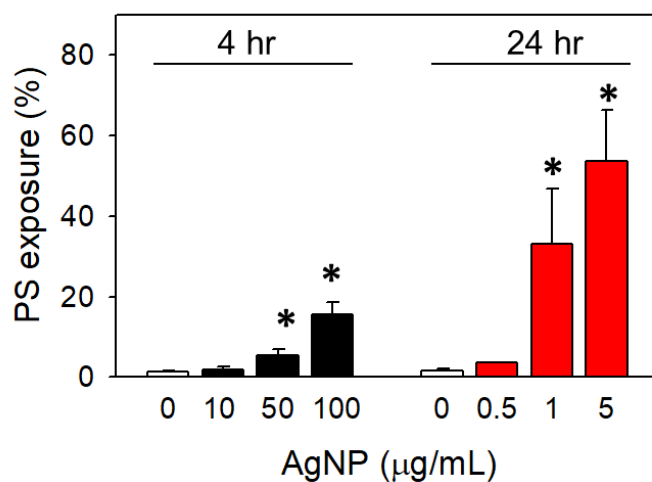
Thrombotic complications often concur with hemolytic anemia as adverse effects of some xenobiotics. However, little is known about the cross-talk between these two events. Here, employing ginsenoside Rg3, one main active component

of ginseng with hemolytic activity, we investigated whether the hemolysis may provoke thrombosis and elucidated the mechanism underlying. Rg3 induced hemolysis of freshly isolated human erythrocytes in time- and concentration-dependent manners. Along with hemolysis, Rg3 led to the formation of holes on the cell membrane of erythrocytes and irregular fragmentation. Resulting erythrocyte debris was observed to expose phosphatidylserine (PS) while residual erythrocytes did not. This phenomenon did not accompany calcium increase or caspase-3 activation, microparticles (MP) generation that are the typical mechanisms underlying PS exposure and erythrocyte-elicited thrombosis as observed with lead acetate (Pb<sup>2+</sup>). Nevertheless, erythrocytes exposed to Rg3 and Pb<sup>2+</sup>, both promoted thrombin generation and exhibited increased adherence to endothelial cells, reflecting that hemolysis, itself can induce procoagulant activation of erythrocytes. These results were further confirmed in vivo where Rg3 administration led to PS-bearing erythrocyte debris and increased thrombosis. Pb<sup>2+</sup> also increased thrombosis but did not produce fragmented erythrocytes. Collectively, these results demonstrated that hemolysis can provoke thrombosis through generating PS-bearing debris, providing an important clue to explain the thrombotic complications appearing as a co-morbidity of hemolysis.

**Keywords:** red blood cells (RBCs), thrombosis, PS exposure, silver nanoparticles (AgNP), ROS generation, cancer therapy, hemolysis, ginsenoside Rg3, debris.



**Supplemental Figure 1** | PS exposure of human RBCs induced by ionic silver (0.1  $\mu\text{M}$ )



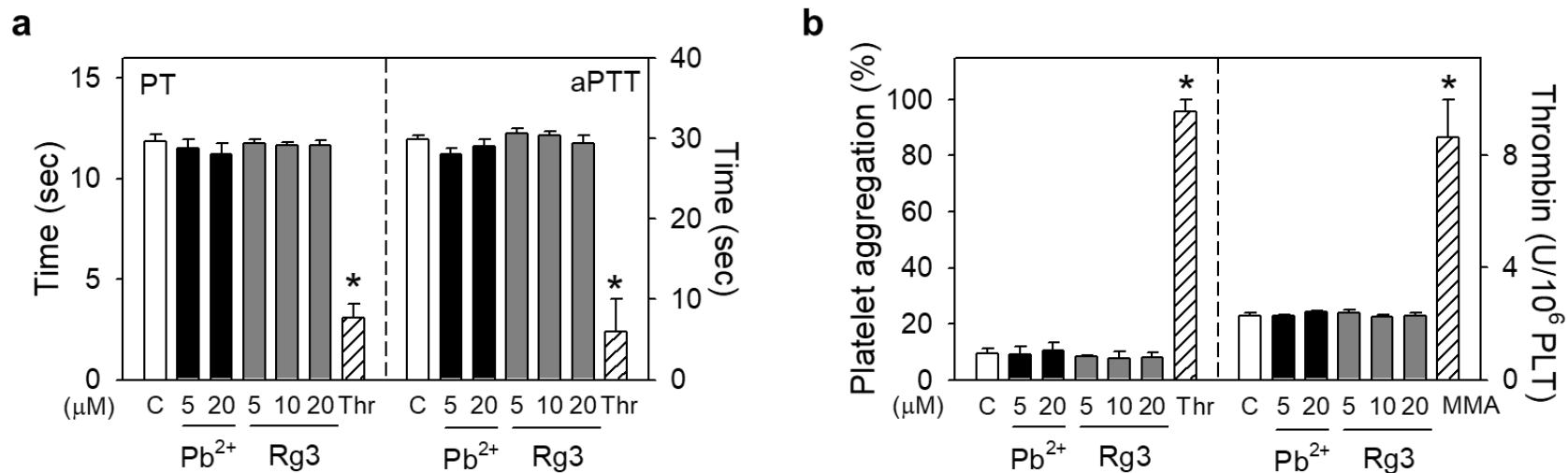
**Supplemental Figure 2** | PS exposure of RBCs induced by low concentrations of AgNP after a prolonged exposure.

**Supplemental Table 1** | Summary of physicochemical properties of AgNP and AgMP.

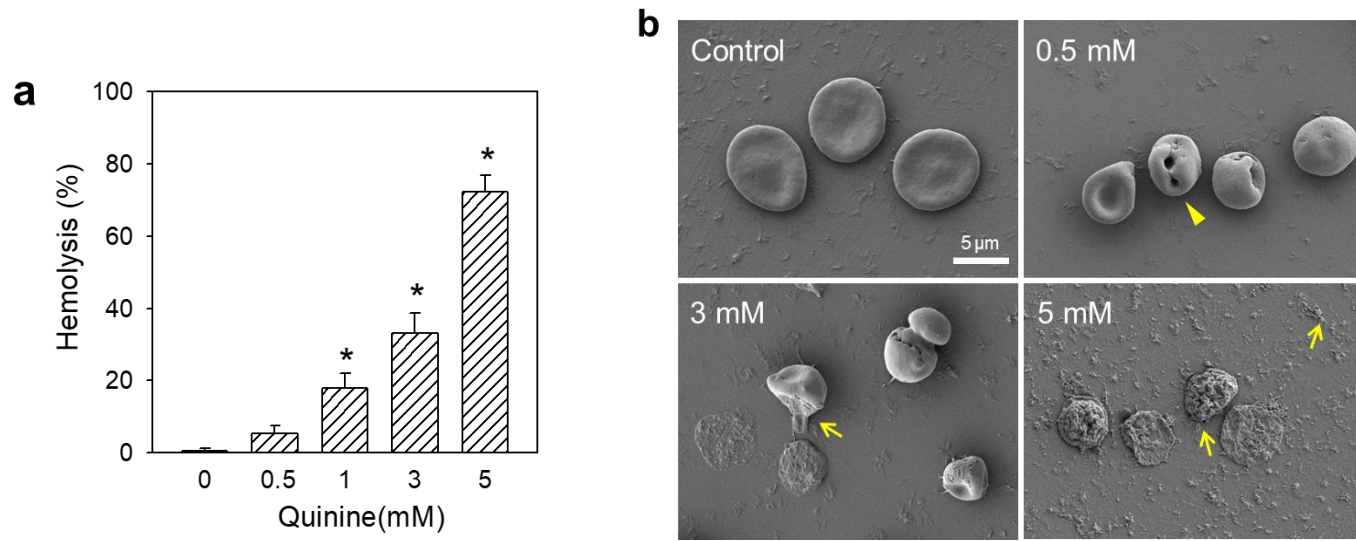
<b>Particles</b>	<b>Morphology</b>	<b>Primary size (Average size)</b>	<b>Peak size by intensity</b>	<b>Zeta potential</b>	<b>The maximum possible percentage of ionic Ag in silver nano-or micro-particle dispersion (µg/mL)</b>
AgNP (Sigma Aldrich)	Spherical <sup>a</sup>	< 100 nm (49.3 nm)	125.4 nm	- 32.07 mV	< 0.01 %
AgMP (Sigma Aldrich)	Spherical <sup>a</sup>	5~8 µm (NA) <sup>a</sup>	NA	- 32.16 mV	< 0.01 %

<sup>a</sup>. Data provided by Sigma Aldrich

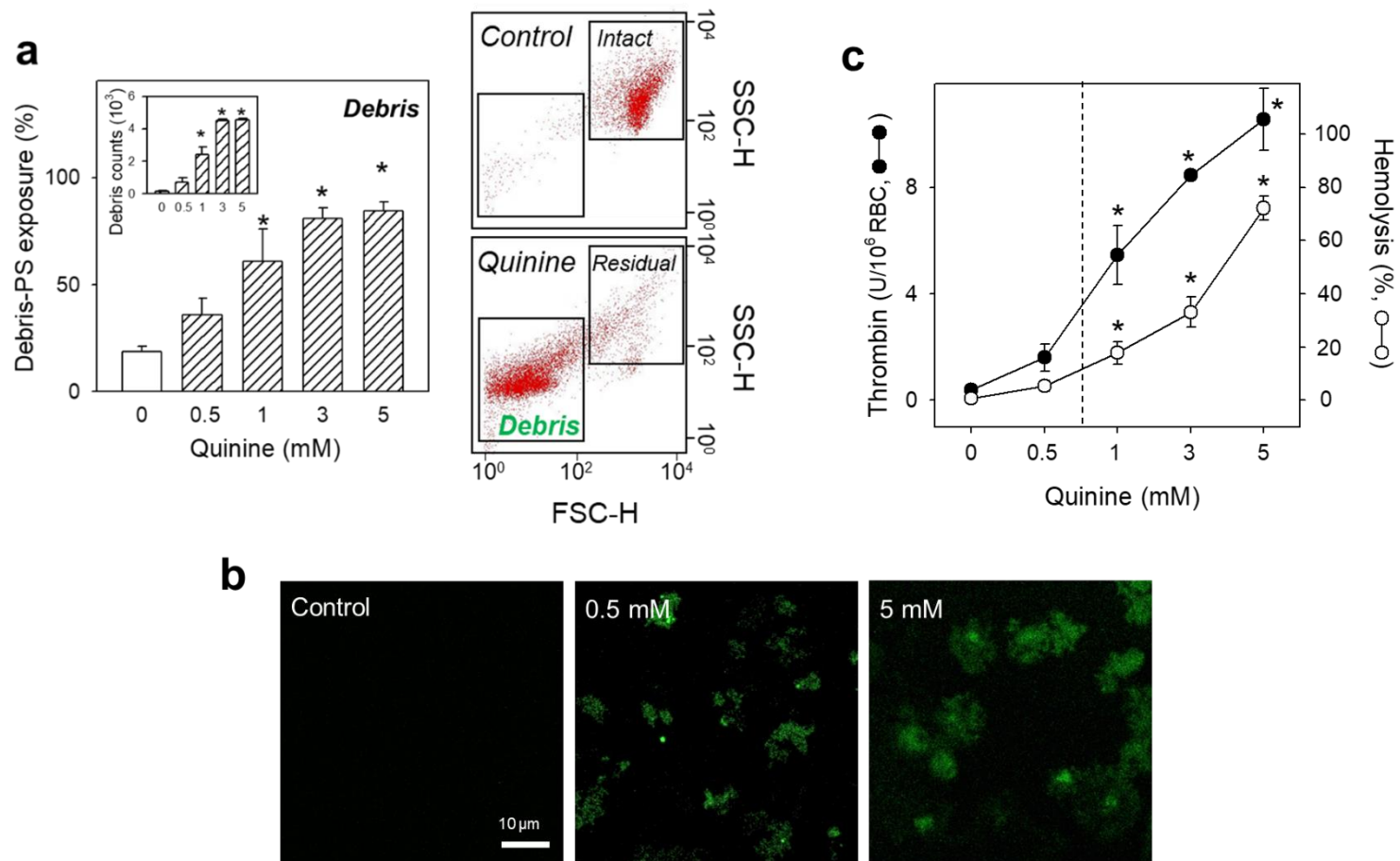
NA: Not Applicable



**Supplemental Figure 3 | Effect of Pb<sup>2+</sup> and Rg3 on platelets activation.** Platelet activation by Pb<sup>2+</sup> and Rg3 was evaluated and no significance was detected in (a) partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT), as well as (b) platelet aggregation and thrombin generation of platelets (PLT) by both chemicals. Thrombin (Thr) 1 unit/mL and monomethylarsonic acid (MMA) 50 μM were used as positive control. Values are mean ± SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group (p < 0.05).



**Supplemental Figure 4 | Effect of quinine on hemolytic activities and morphological changes in RBCs.** (a) After RBCs were treated with 0, 0.5, 1, 3, 5 mM quinine hydrochloride for 24 hours, hemolysis was measured at 540 nm. (b) Morphological changes were observed using scanning electron microscope. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ ).





**Supplemental Figure 5 | Identification of PS exposure of RBC debris and biological effects induced by quinine.** (a) After RBCs were treated with 0, 0.5, 1, 3, 5 mM quinine hydrochloride for 24 hours, PS exposure in intact RBC and debris were both increased in a dose-dependent manner determined and analyzed according to size using flow cytometry. (b) PS exposure of RBC debris was identified using annexin V-FTIC binding to exposed PS. (c) Enhancement of thrombin generation (black circle) was measured by pro-thrombinase assay at 405nm, and hemolytic activity (white circle) was measured at 540 nm. Values are mean  $\pm$  SE of more than three independent experiments, \* represents significant differences from control group ( $p < 0.05$ )